UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE FARBSTOFFE VON PILZEN
DER GATTUNGEN
CORTINARIUS ANTHRACOPHYLLUM UND BOLETOPSIS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

ELISABETH JÄGERS
aus
LAAGE Kreis Güstrow

BONN 1980

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FARBSTOFFE VON PILZEN DER GATTUNGEN CORTINARIUS ANTHRACOPHYLLUM UND BOLETOPSIS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

ELISABETH JÄGERS
aus

LAAGE Kreis Güstrow

BONN 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Referent: Prof.Dr. Wolfgang Steglich

Koreferent: Prof.Dr. Fritz Vögtle

Tag der Promotion: 13. Mai 1980

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meinen Eltern und Erhard gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof.Dr. Wolfgang Steglich in der Zeit von Juli 1976 bis November 1979 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof.Dr. Wolfgang Steglich für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit, für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen und vor allem für die immer wieder vermittelte Begeisterung für die Naturstoffchemie.

Herrn Prof.Dr. Meinhard Moser, Innsbruck und Herrn Dr. H.Besl, Regensburg danke ich für die Beschaffung von Pilzen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546506_0025

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Allgemeiner Teil	
1.	Die Gattung CORTINARIUS, Untergattung PHLEGMACIUM	2
2.	Die Pigmente der Phlegmacien	2
2.1.	Pigmente vom Flavomannintyp	3
2.2.	Pigmente vom Phlegmacintyp	6
3.	Die Biosynthese der Phlegmacienpigmente und der Anthrachinone aus Höheren Pilzen	9
4.	Neuere Anthrachinonsynthesen	13
4.1.	Die biomimetische Synthese	13
4.2.	Reaktion von Ketenacetalen mit Halogenchinonen	15
III.	Spezieller Teil	17
A.	Neue Pigmente aus PHLEGMACIUM-Arten	17
1.	Die Pigmente aus CORTINARIUS ELEGANTIOR Fr.	17
1.1.	C.ELEGANTIOR-typische Form	18
1.1.1	Der Pilz	
1.1.2.	Aufarbeitung der Pilze	18
1.1.3.	Isolierung der Anthrachinoncarbonsäuren	18

1.1.4.	Isolierung der Hauptpigmente	19
1.1.5.	Strukturaufklärung der beiden gelben Nebenpigmente und des Fluoreszensstoffes	22
1.1.5.1	Alkalische Oxidation von Cortinarin	27
1.1.6.	Diskussion der Stereoisomeren des Cortinarins (43)	29
1.1.6.1	Konformation sterisch gehinderter Diarylether	29
1.1.6.2	Bestimmung der Rotationsbarriere durch Koaleszenzmessung	33
1.2.	C.ELEGANTIOR-abweichende Form	36
1.2.1.	Der Pilz	36
1.2.2.	Aufarbeitung der Pilze	36
1.2.3.	Isolierung und Identifizierung der Pigmente	37
1.2.4.	Vergleich der beiden Formen von C.ELEGANTIOR	39
1.2.5.	Zur Stereochemie der Phlegmacien-Pigmente	4o
2.	Die Pigmente aus C.ATROVIRENS (Kalchbr)	46
2.1.	Der Pilz	46
2.2.	Aufarbeitung der Pilze	46
2.3.	Isolierung der Pigmente	47
2.4.	Strukturaufklärung des Pigments Grün 4-Atrochryson (19)	47

2.5.	Strukturaufklärung des Atrovirins(48) und des 4-Hydroxyatrochrysons(50)	52
2.5.1.	Spektroskopische Daten von Atrovirin	52
2.5.2.	Oxidation zu Skyrin (49)	53
2.5.3.	Spektroskopische Daten von 4-Hydroxy-atrochryson	55
2.5.4.	Oxidation zu Catenarin (51)	58
2.6.	Strukturaufklärung von 4,4'-Dioxo-atrovirin (52)	58
2.6.1.	Spektroskopische Daten	59
2.6.2.	Oxidation zu Dicatenarin (54)	63
2.7.	Identifizierung der gelben und roten Pigmente	64
2.8.	Zur Stereochemie der Pigmente	67
2.9.	Bedeutung der Pigmente für die Biosynthese	7o
3.	Die Pigmente aus C.AUREOTURBINATUS	74
3.1.	Der Pilz	74
3.2.	Aufarbeitung der Pilze	74
3.3.	Die Pigmente	74
3.4.	Zur Stereochemie von Phlegmacin (9)	76
3.5.	Bestimmung der Rotationsbarriere durch Koaleszenzmessung	78
4.	Die Pigmente aus C.RUFOOLIVACEUS (Fr.) Wünsche	8o
4.1.	Der Pilz	8o
4.2.	Aufarbeitung der Pilze	8o

4.3.	Strukturaufklärung der beiden gelben und der farblosen Substanz	81
4.4.	Srukturaufklärung des roten Farbstoffs V2	84
4.5.	Strukturaufklärung des roten Hauptpigments V1	88
4.6.	Zur Stereochemie von 2-Hydroxyrufoolivacin (62)	93
4.7.	Zur Biosynthese der roten Farbstoffe	96
4.8.	Aufarbeitung von frischen Fruchtkörpern von C.RUFOOLIVACEUS	1o1
4.9.	Strukturaufklärung des Fluoreszenzstoffes (78)	1o2
5.	Aufarbeitung von Kulturen von C.ORICHALCEUS	1o6
5.1.	Isolierung der Pigmente	1o6
5.2.	Identifizierung der Pigmente	1o7
6.	^{13}C-NMR-Spektren von Phlegmacien-Pigmenten	1o8
6.1.	Flavomannin-6,6'-dimethylether	11o
6.2.	Flavomannin-6,6',8'-trimethylether	11o
6.3.	4-Hydroxyflavomannin-6,6'-dimethylether	111
6.4.	Phlegmacin	111
6.5.	Anhydrophlegmacin-9,1o-chinon	112
6.6.	Phlegmacin-8'-methylether	112
6.7.	4,4'-Dioxoatrovirin	113

6.8.	Cortinarin	113
7.	^{13}C-NMR-Spektren von Anthrachinonen	114
B.	Die Farbstoffe aus ANTHRACOPHYLLUM-Arten und aus BOLETOPSIS LEUCOMELAS	116
1.	Die Gattung ANTHRACOPHYLLUM	116
1.1.	ANTHRACOPHYLLUM DISCOLOR (Montagne) Singer	116
1.1.1.	Aufarbeitung der Pilze	116
1.1.2.	Strukturaufklärung des gelben Hauptpigments	117
1.1.3.	Strukturaufklärung der braunen Nebenpigmente	119
1.1.4.	Bestimmung der Lage der Acetatgruppen durch Berechnung der Acetatverschiebung	119
1.1.5.	Synthese von Braun 2 (83) ausgehend von Leucomelon (86)	121
1.1.6.	Terphenylchinone aus Höheren Pilzen	122
1.1.7.	Die Biosynthese der Terphenylchinone	124
1.2.	ANTHRACOPHYLLUM 73/208	125
1.2.1.	Aufarbeitung der Pilze	125
1.2.2.	Isolierung der Pigmente	126
1.2.3.	Strukturaufklärung des auberginefarbenen Pigments	127
1.2.3.	Vergleich von Cyclovariegatin (94) mit einem aus SUILLUS GREVILLII isolierten Thelephorsäurevorläufer und mit synthetischem Material	128

1.2.3.1	Vergleich der NMR-Spektren	131
1.2.4.	Strukturauklärung der gelben Pigmente	132
1.2.5.	Diskussion der Ergebnisse	134
2.	Die Pigmente aus BOLETOPSIS LEUCOMELAS (Pers.ex Fr) Fayod	136
2.1.	Der Pilz	136
2.2.	Aufarbeitung der Pilze	136
2.3.	Isolierung der Pigmente	137
2.4.	Strukturaufklärung der farblosen Substanzen	139
2.5.	Aufarbeitung des methanolischen Extrakts von B.LEUCOMELAS	142
2.6.	Strukturaufklärung der Pigmente	142
2.7.	Vergleich von Leucomelon und Cycloleucomelon	146
2.8.	Diskussion der Ergebnisse	149
IV.	Zusammenfassung	15o
V.	Experimenteller Teil	152
1.	C.ELEGANTIOR	154
1.1.	C.ELEGANTIOR-typische Form	154
1.1.1.	Aufarbeitung der Pilze	154
1.1.2.	Isolierung der Anthrachinoncarbonsäuren	154
1.1.3.	Isolierung der Hauptpigmente	155
	Cortinarin (43)	156
	Oxidation von Cortinarin	157

	Flavomannin-6,6',8'-trimethylether(3)	158
	Anhydroflavomannin-9,1o-chinon-6,6'8'-trimethylether (41)	159
	Anhydroflavomannin-9',1o'-chinon-6,6',8'-trimethylether (42)	16o
1.2.	C.ELEGANTIOR-abweichende Form	161
1.2.1.	Aufarbeitung der Pilze	161
1.2.2.	Isolierung der Pigmente	161
	Anhydrophlegmacin-9,1o-chinon-8'-methylether (45)	162
	Phlegmacin-8'-methylether B_2 (1o)	162
2.	C.ATROVIRENS	164
2.1.	Aufarbeitung der Pilze	164
2.2.	Isolierung der Pigmente	164
	Atrochryson (19)	165
	Alkalische Oxidation zu Emodin	166
	Atrovirin B_1 (48)	167
	Alkalische Oxidation zu Skyrin	167
	4-Hydroxyatrochryson (5o)	168
	Alkalische Oxidation zu Catenarin	168
	4,4'-Dioxoatrovirin (52)	169
	Alkalische Oxidation und reduktive Spaltung	169
	Skyrin (49)	171
	Anhydro-4,4'-dioxoatrovirin-9,1o-chinon (55)	171
	Anhydroatrovirin-9,1o-chinon (56)	172

3.	C.AUREOTURBINATUS	173
3.1.	Aufarbeitung der Pilze	173
3.2.	Isolierung der Pigmente	173
	Phlegmacin B_1 (9)	174
	Anhydrophlegmacin-9,1o-chinon (11)	174
4.	C.RUFOOLIVACEUS	175
4.1.	Aufarbeitung der Pilze	175
4.2.	Isolierung der Pigmente	175
	Torachryson-8-methylether (59)	176
	Rufoolivacin (61)	176
	2-Hydroxyrufoolivacin (62)	177
4.3.	Aufarbeitung von frischem C.RUFO-OLIVACEUS	179
	Leucurufoolivacin (78)	18o
5.	Mycelkulturen von C.ORICHALCEUS	182
5.1.	Aufarbeitung der Kulturen	182
5.2.	Isolierung der Pigmente	182
6.	ANTHRACOPHYLLUM DISCOLOR	184
6.1.	Aufarbeitung der Pilze	184
6.2.	Isolierung der Pigmente	184
	Cycloleucomelondiacetat (82)	185
	Peracetylierung von 82	185
	Cycloleucomelon (83)	186
	Cyclisierung von Leucomelon (86)	186
7.	ANTHRACOPHYLLUM 73/2o8	187
7.1.	Aufarbeitung der Pilze	187

7.2.	Isolierung der Pigmente	187
	Thelephorsäure (89)	188
	Cyclovariegatin-monoacetat (93)	188
	Cyclovariegatin-3,5',4"-tri-acetat (96)	188
	Peracetylierung von 93	189
	Synthese von Cyclvariegatin (94)	189
	Acetylierung von 94	19o
8.	BOLETOPSIS LEUCOMELAS	191
8.1.	Aufarbeitung der frischen Pilze	191
8.2.	Isolierung der Substanzen	191
	Thelephorsäure-leucoperacetat (97)	192
	Cycloleucomelon-leucoperacetat (98)	192
	Cycloleucomelon-leucopentaacetat(99) und (1oo)	192
	Cycloleucomelon-leucotetraacetat(1o1)	193
	Cycloleucomelon-leucotriacetat (1o2)	193
	Peracetylierung des Rohextrakts	193
8.3.	Aufarbeitung eines methanolischen Extrakts von B.LEUCOMELAS	194
	3-(4-Hydroxyphenyl)-1,4-diacetoxy-2-hydroxydibenzofuran-7,8-dion (1o4)	195
	Reduktive Acetylierung von 1o4	195
VI.	Literaturverzeichnis	196

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	NMR-Spektrum von Cortinarin (43)	25
Abb. 2	Temperaturabhängigkeit des NMR-Spektrums von 43	34
Abb. 3	ORD- und CD-Kurven im Bereich einer Absorptionsbande	41
Abb.4	CD- und ORD-Kurven von Phlegmacien-Pigmenten	
	a. Flavomannin-6,6'-dimethylether A_1	43
	b. Flavomannin-6,6',8'-trimethyl-ether B	43
	c. Phlegmacin B_1	44
	d. Phlegmacin-8'-methylether B_2	44
Abb. 5	CD-Kurve von Cortinarin	45
Abb. 6	Vergleich der UV-Spektren	56
Abb. 7	UV-Spektren von Atrovirin und Dioxo-atrovirin	61
Abb. 8	CD-Kurven von Atrovirin B_1 und Di-oxoatrovirin A_1	68
Abb. 9	CD-Kurve von Skyrin (49)	69
Abb.1o	NMR-Spektrum von Rufoolivacin (61)	86
Abb.11	UV-Spektren von 61 und 2-Hydroxy-rufoolivacin (62)	87
Abb.12	NMR-Spektrum von 2-Hydroxyrufo-olivacin (62)	89
Abb.13	HPLC-Chromatogramm von V1 (62)	91
Abb.14	CD-Kurven von V1/1 und V1/3	95

I. EINLEITUNG

Farben spielten im Laufe der Kulturgeschichte eine große Rolle, denn von jeher war der Mensch bestrebt, seine Umwelt farbig zu gestalten. Dafür standen ihm in erster Linie natürliche Farbstoffe zur Verfügung. Einige unter ihnen, wie z.B. Indigo, Kermeskarmin, Krapplack oder der rote Farbstoff der Purpurschnecke, waren besonders begehrt und konnten sogar wirtschaftliche Bedeutung erlangen.

Aber auch heute, wo sie durch synthetische Produkte immer mehr verdrängt werden, haben die natürlichen Farbstoffe nichts von ihrer Anziehungskraft verloren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung von Pigmenten aus Höheren Pilzen, deren Farbstoffe nicht zuletzt aus chemotaxonomischen Gründen die Wissenschaftler seit langem interessieren.

II. ALLGEMEINER TEIL

1. Die Gattung CORTINARIUS, Untergattung PHLEGMACIUM

Die Gattung CORTINARIUS, die umfangreichste Gattung der Blätterpilze (AGARICALES), umfaßt eine große Zahl verschiedenartiger Pilze. Man unterteilt die Cortinarien in sechs Untergattungen, unter denen sich die Gattung PHLEGMACIUM durch ihre besondere Farbenvielfalt hervorhebt[1].

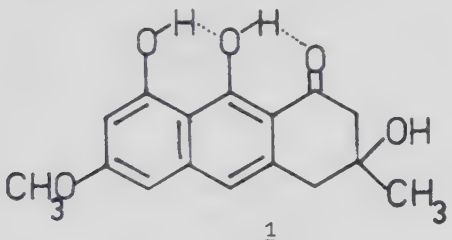
Die Phlegmacien sind große,fleischige Pilze mit oft knolliger Stielbasis und auffallend gelb, gelbgrün, grün oder auch rotviolett gefärbten Fruchtkörpern.

2. Die Pigmente der Phlegmacien

Erste Versuche zur Strukturaufklärung der Phlegmacienpigmente gehen zurück auf M.Gabriel[2], die verschiedene gelbe und gelbgrüne Arten (CORTINARIUS ELEGANTIOR Fr., C. ORICHALCEUS Batsch ex Fr.,C. ODORIFER Britz., C. ATROVIRENS Kalchbr., C. PERCOMIS Fr. und C. NANCEIENSIS R.Maire) chromatographisch untersuchte. Dabei konnte sie bei allen Arten gelbe bis gelbgrüne Pigmente nachweisen, die sie als 'Antranole' bezeichnete. Das hervorstechende Merkmal dieser 'Anthranole' ist ihre Oxidationsempfindlichkeit: beim Behandeln mit Lauge gehen sie mehr oder weniger rasch in Anthrachinone über.

In ihrer Doktorarbeit begann E.Töpfer-Petersen[3] mit der

genauen Strukturuntersuchung der 'Anthranole'. Sie isolierte die Pigmente einiger der genannten Arten und identifizierte sie als dimere Tetrahydroanthracenderivate, genauer als Dimere des 3,4-Dihydro-3,8,9-trihydroxy-6-methoxyanthracen-1-ons (1).



1

Je nach Verknüpfungsart der beiden Monomerenhälften konnte sie zwei Verbindungstypen unterscheiden: den symmetrisch in 7,7'-Stellung verknüpften Flavomannintyp und den in 7,1o'-Stellung verknüpften Phlegmacintyp.

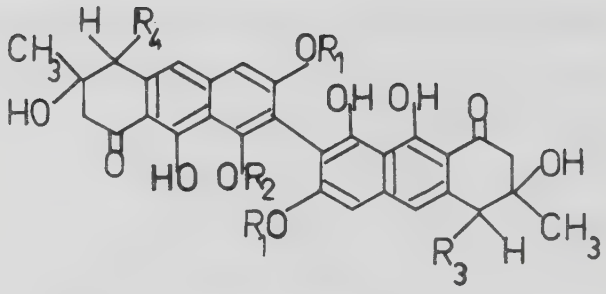
2.1. Pigmente vom Flavomannintyp

Das Hauptpigment von C.VITELLINUS, dem Dottergelben Klumpfuß, besitzt die Struktur eines 4-Hydroxy flavomannin-6,6'-dimethylethers (2)[4].

Flavomannin-6,6',8'-trimethylether (3) konnte Töpfer-Petersen[3] in C.ELEGANTIOR nachweisen.

Pigmente dieses Typs scheinen bei Höheren Pilzen weit verbreitet zu sein. So wurde in verschiedenen Arten der Sektion DERMOCYBE -Hautköpfe- (DERMOCYBE CINNAMOMEALUTEA, D. PALUSTRIS und D. ULIGINOSA) Flavomannin-6,6'-dimethyl-

ether (4) als gelbes Hauptpigment identifiziert[5].



2 $R_1 = CH_3$, $R_3 = OH$, $R_2 = R_4 = H$

3 $R_1 = R_2 = CH_3$, $R_3 = R_4 = H$

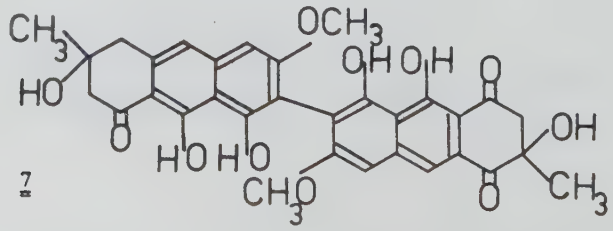
4 $R_1 = CH_3$, $R_2 = R_3 = R_4 = H$

5 $R_1 = CH_3$, $R_3 = R_4 = OH$, $R_2 = H$

6 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

Nach Moser[6] ist 4 das Leitpigment der Sektion DERMOCYBE .

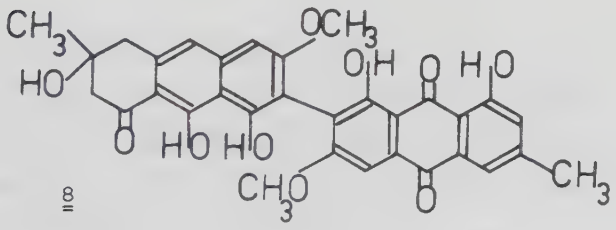
Flavomannin-6,6'-dimethylether konnte auch in zwei TRICHOLOMA-Arten (T.FLAVOVIRENS und T.SULFUREUM) nachgewiesen werden[7]. T.SULFUREUM bildet außerdem drei weitere Pigmente vom Flavomannintyp: 4-Hydroxyflavomannin-6,6'-dimethylether (2), 4,4'-Dihydroxyflavomannin-6,6'-dimethylether (5),und 4-Oxoflavomannin- 6,6'-dimethylether (7).



7

Interessant ist, daß alle Flavomanninderivate, die bisher aus Höheren Pilzen isoliert wurden, in 6-Stellung methyliert sind. Die unsubstituierte Stammverbindung 6, das Flavomannin, konnten Roberts et al.[8] aus Kulturen von PENICILLIUM WORTMANNI Klöck isolieren.

Als Begleiter der Flavomanninpigmente treten bei den untersuchten Pilzen gelbe Farbstoffe auf, bei denen eine Molekülhälfte zum Anthrachinon aufoxidiert ist. Diese Nebenpigmente sind demnach Derivate des Anhydroflavomannin-9,1o-chinons (8).



8

Alle bisher beschriebenen Flavomannin-derivate sind gelbe, mikrokristalline Substanzen mit auffallender Oxidationsempfindlichkeit. Läßt man Chloroformlösungen dieser Farbstoffe stehen, so bildet sich bereits nach kurzer Zeit ein Gemisch von roten und rotbraunen Oxidationsprodukten. Die MS und NMR-Spektren der Flavomannine sind aufgrund der symmetrischen Molekülstruktur

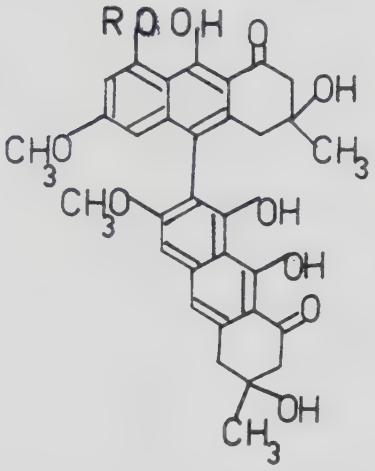
relativ einfach. Die Diskussion der spektroskopischen Daten wird erst an späteren Stelle erfolgen.
Auch die sehr interessante Stereochemie der Flavomannine soll hier zunächst nur kurz erwähnt werden. Die Verbindungen besitzen in 3- bzw. 3'-Stellung Chiralitätszentren, außerdem tritt aufgrund behinderter Rotation um die Biarylbindung eine axiale Chiralität auf. Charakteristisch für diese optisch aktiven Biaryle - die Atropisomeren - sind ORD- bzw. CD-Kurven mit starkem Cotton-Effekt zwischen 27o und 3oo nm (s. S.4o).

2.2. Pigmente vom Phlegmacintyp

Phlegmacin (9), das gelbe Hauptpigment des Anisklumpfußes, C.ODORIFER Britz., ist isomer mit Flavomannin-6,6'-dimethylether. Die Hälfte der Signale seines NMR-Spektrums stimmt mit denen des Flavomanninderivats überein, während die anderen Signale einem Tetrahydroanthracensystem zugeordnet werden können, das in 1o-Stellung substituiert ist. Demnach liegt im Phlegmacin eine 7,1o'-Verknüpfung der Molekülhälften vor.
Auch aus C.AUREOFULVUS konnte Phlegmacin als Hauptpigment isoliert werden[3,9].

Eng verwandt mit Phlegmacin (9) ist das Pigment aus C.PECOMIS, das sich nur durch eine zusätzliche Methylgruppe unterscheidet. Phlegmacin-8'-methylether (1o)

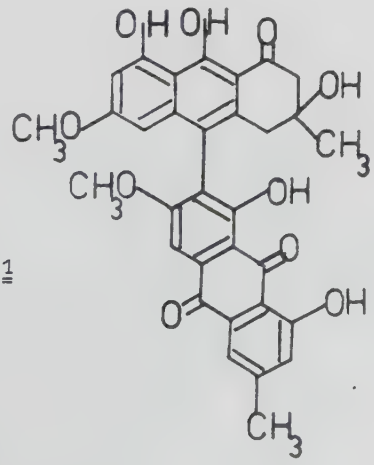
wurde auch in C.GUTTATUS und C.NANCEIENSIS nachgewiesen[3,10].



(9) R =H

(10) R =CH_3

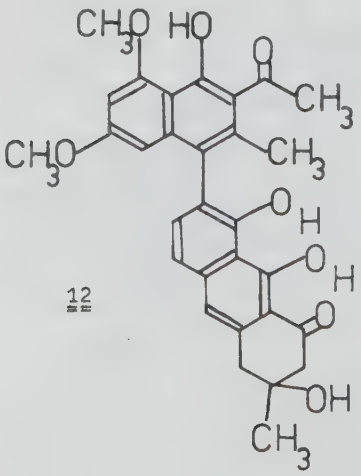
Begleitet werden die Pigmente des Phlegmacintyps von Nebenpigmenten, in denen, wie beim Flavomannintyp beschrieben, eine Molekülhälfte zum Anthrachinon aufoxidiert ist. Diese Nebenpigmente sind Derivate des Anhydrophlegmacin-9,10-chinons (11).



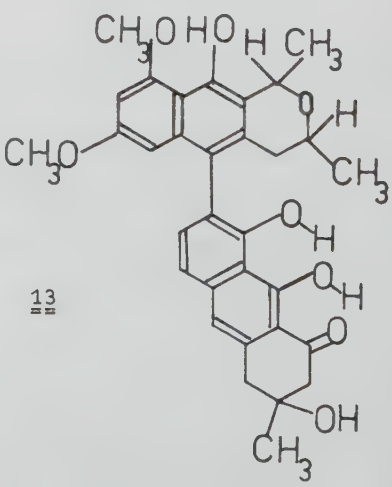
11

Aus einer höheren Pflanze, CASSIA TOROSA (Leguminosae) konnte Shibata[11] ebenfalls Phlegmacin und Anhydrophlegmacin-9,1o-chinon isolieren, die aber interessanterweise die Enantiomeren der Phlegmacienpigmente darstellen.

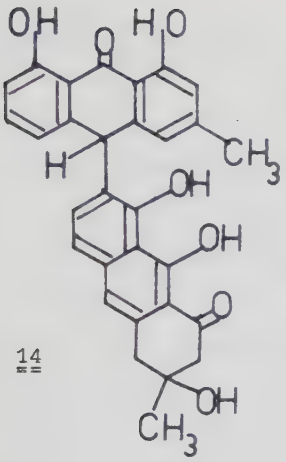
In diesem Zusammenhang seien Substanzen erwähnt, die Daves et al.[12] aus den Samen und den reifen Früchten von KARWINSKIA HUMBOLDTIANA Zucc. (Rhamnaceae) isolieren konnten. Diese Substanzen sind die neuro - toxischen Wirkstoffe der mittelamerikanischen Pflanze, deren Giftigkeit schon seit Jahrhunderten bekannt ist. Es sind dimere Verbindungen, deren eine Molekülhälfte stets ein 3,4-Dihydro-8,9-dihydroxyanthracen-1-on ist. Die andere Molekülhälfte kann entweder ein 2-Acetylnaphthol-Derivat (12), ein Naphthopyran-9-on (13), ein 1,8-Dihdroxyanthracen-9-on (14) oder ein 8,9-Dihydroxyanthracen-1-on (15) sein. Die Verbindung 15 ist eng verwandt mit Phlegmacin (9), sie unterscheidet sich nur durch die OCH_3-Gruppe an C-6.



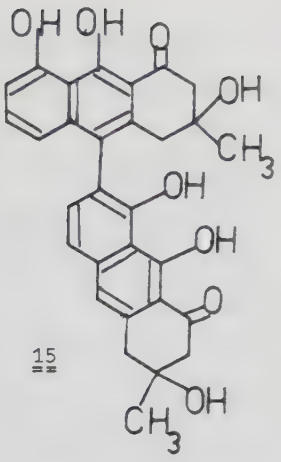
12



13



14



15

3. Die Biosynthese der Phlegmacienpigmente und der Anthrachinone aus Höheren Pilzen.

Phlegmacin- und Flavomanninderivate werden wie die Pilz-Anthrachinone biosynthetisch aus Acetateinheiten aufgebaut.

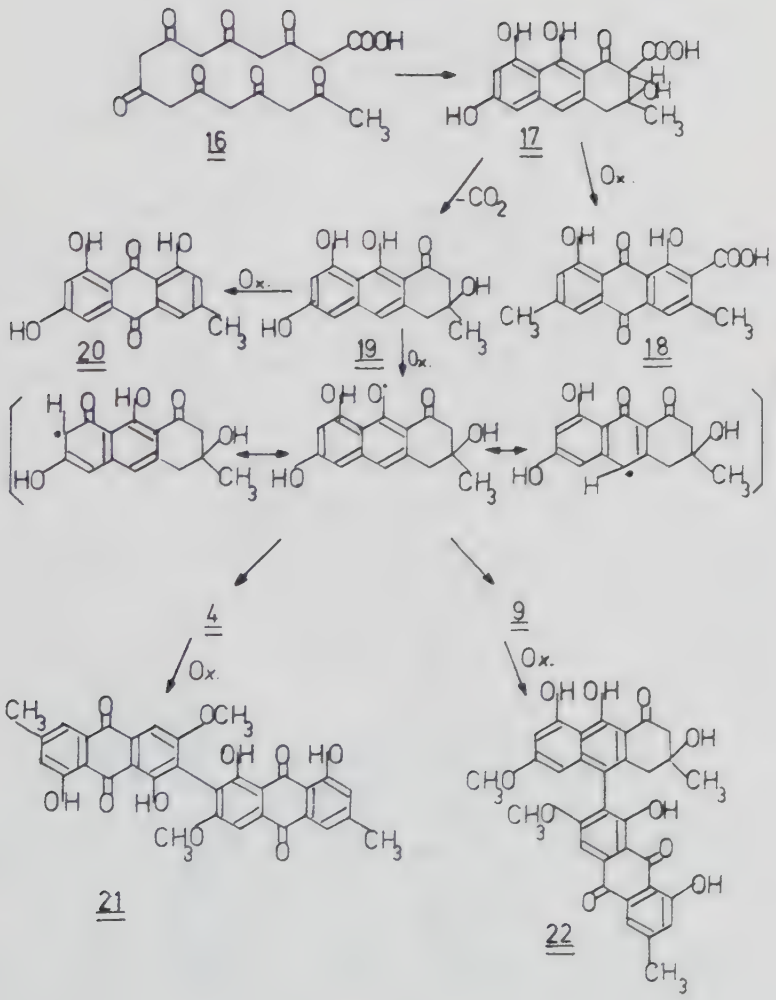
Bereits vor Jahren wurde diese Polyketidbiogenese postuliert und später durch Markierungsversuche mit ^{14}C -Acetat bewiesen[13,14].

Ausgehend von einem Oktaketid 16, entstanden durch Kondensation von einem Acetyl-Coenzym A mit sieben Malonateinheiten, wird durch intramolekulare Aldolkondensationen und anschließender Decarboxylierung ein Tetrahydroanthracenderivat 19 gebildet. Diese Verbindung kann als Schlüsselverbindung der Biogenese angesehen werden. Aus ihr

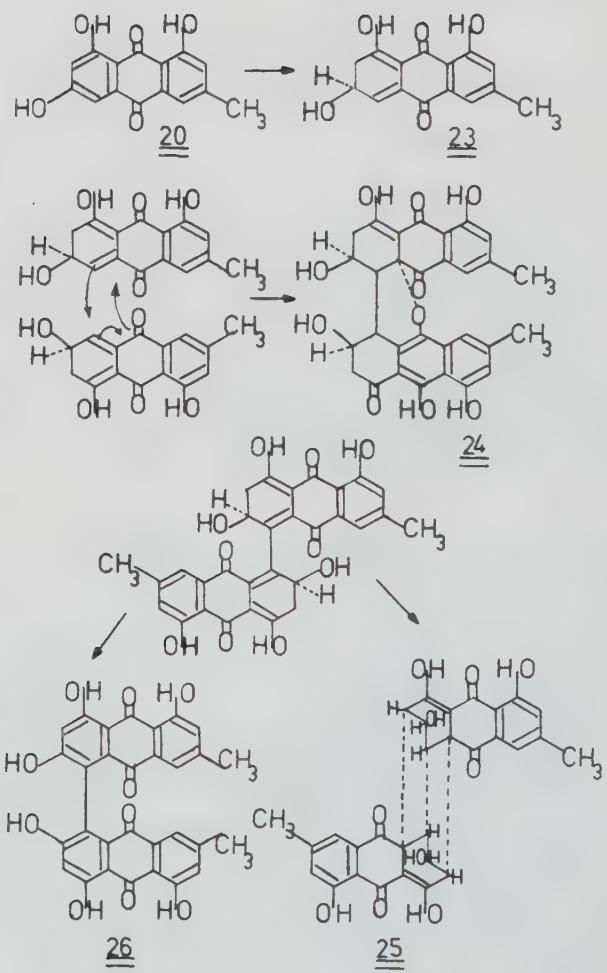
entstehen einerseits durch Wasserabspaltung, Enolisierung und Oxidation das Anthrachinon Emodin (20) und seine Derivate. Anderseits entsteht durch Oxidation ein Phenolradikal, für das eine Zahl mesomerer Grenzstrukturen formuliert werden kann.
Kopplung zweier solcher Phenolradikale führt zu dimeren Tetrahydroanthracenen, wie den bisher aufgezeigten Flavomannin- und Phlegmacinderivaten. Aus ihnen werden schließlich die entsprechenden Bianthrachinone 21 und 22 gebildet.
Die naheliegende Annahme, daß Emodin (20) durch Decarboxylierung von Endocrocin (18) entsteht, erwies sich nach Verfütterungsversuchen mit ^{14}C-markiertem 18 an DERMOCYBE als sehr unwahrscheinlich[15]. (Schema 1)

Shibata[16] isolierte aus PENICILLIUM-Arten verschiedene Bianthrachinone und postulierte für sie ebenfalls einen Polyketidbiosyntheseweg, in dem aber die Dimerisierung nicht durch oxidative Phenolkopplung, sondern durch eine Diels-Alder-Cycloaddition von partiell hydriertem Emodin (23) erfolgen soll. Die Isolierung von Verbindungen wie Emodin (20), Rugulusin (25), Flavoskyrin (24) und Skyrin (26) z.B. aus P. ISLANDICUM ließ auf dieses Schema schließen, das auch durch ^{14}C-Markierungsversuche bestätigt werden konnte. (Schema 2)

Schema 1



Schema 2



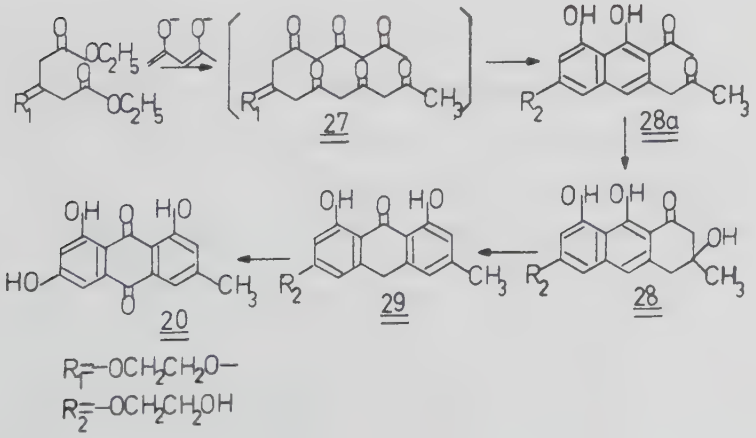
4. Neuere Anthrachinonsynthesen

In den letzten Jahren wurden verstärkt neue Synthesewege für Anthrachinone erarbeitet, nicht zuletzt wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den Anthracyclin-Antibiotika. An dieser Stelle seien zwei besonders interessante Synthesen vorgestellt.

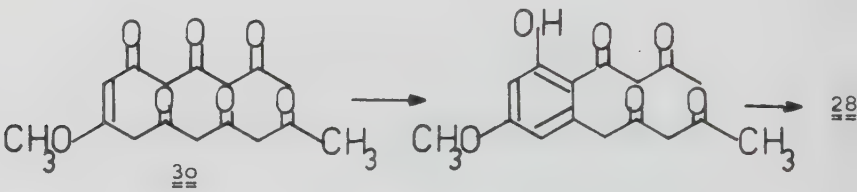
4.1 Die biomimetische Synthese

T.H.Harris und Mitarbeiter[17] beschreiben eine Synthese für Emodin (20), die sich an den Biosyntheseweg der Anthrachinone anlehnt.

Die Reaktion verläuft über ein Heptaketid 27, das durch eine Acetalschutzgruppe in 6-Stellung kontrolliert zu dem Naphthalinderivat 28a und anschließend zum gewünschten Tetrahydroanthracen 28 cyclisiert. Wasserabspaltung und Isomerisierung führt zum Anthron 29, das mit CrO_3 zum Anthrachinon 20 aufoxidiert wird.



Für den entscheidenden Schritt innerhalb dieser Synthese, die kontrollierte Faltung und Cyclisierung der Kette, schlagen Staunton, Evans et al[18] die Einführung eines Enolethers 30 in 6-Stellung vor, der durch seine (E)-Konfiguration die Kette in der gewünschten Richtung fixiert.



30 28

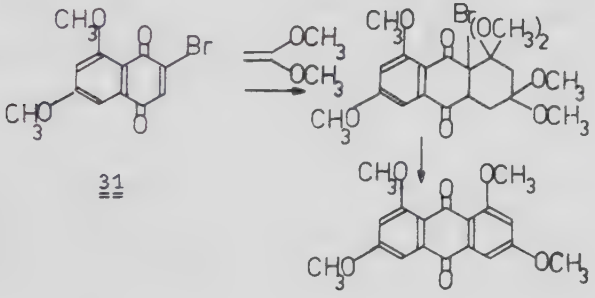
Aus der Tatsache, daß eine große Zahl der natürlich vorkommenden Anthrachinone und Anthrachinonvorläufer in 6-Stellung methyliert sind, schlossen diese Autoren, daß auch die Biosynthese über eine Enoletherzwischenstufe verlaufen könnte.

Biomimetische Synthesen ausgehend von Polyketonen wurden schon für eine Vielzahl von natürlich vorkommenden phenolischen Verbindungen durchgeführt[19]. In manchen Fällen konnte durch die Synthese ein postulierter Polyketidbiosyntheseweg bestätigt werden.

4.2. Reaktion von Ketenacetalen mit Halogenchinonen

Eine elegante Synthese für verschiedene substituierte Anthrachinone wurde von Brassard und Mitarbeitern[20] entwickelt.

2-Brom-6,8-dimethoxynaphthochinon (31) reagiert unter Cycloaddition mit Ketendimethylacetal zu 1,3,6,8-Tetramethoxyanthrachinon (32).

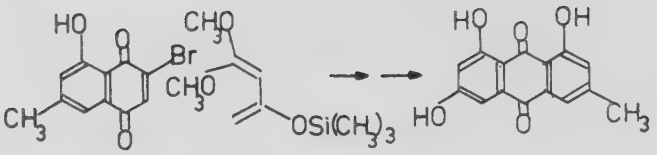


31

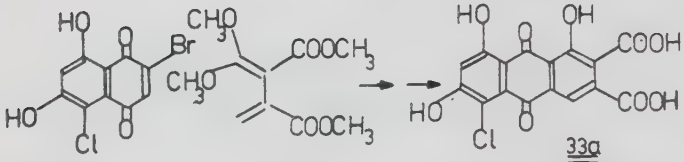
32

Setzt man statt Ketenacetalen verschieden substituierte 1,1-Dimethoxybutadiene ein, bzw. variiert das Substitutionsmuster des 2-Bromnaphthochinons, so erhält man z.B. einige der Anthrachinone aus Höheren Pilzen.

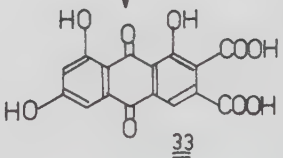
Als Beispiel seien die Reaktionsgleichungen für Emodin(20) und für eine Chlor-Anthrachinondicarbonsäure 33a angeführt, die durch reduktive Chlorabspaltung in die aus CORTINARIUS ELEGANTIOR isolierte Cortinarsäure (33) umgewandelt werden kann.



20



33a



33

III. SPEZIELLER TEIL

A. Neue Pigmente aus PHLEGMACIUM-Arten

1. Die Pigmente aus CORTINARIUS ELEGANTIOR Fr.

Nach den Untersuchungen von Töpfer-Petersen[3] enthält C.ELEGANTIOR - der Strohgelbe Klumpfuß - ein Gemisch von Flavomannin-6,6',8'-trimethylether (3) und Phlegmacin-8-methylether (10). Da aber der Farbstoffgehalt und die Zusammensetzung bei den verschiedenen Aufsammlungen stark variierten, sollte dieser Pilz noch einmal aufgearbeitet werden.

Im Herbst 1978 konnten im Oberjoch/Allgäu und in Nassereith/Tirol eine größere Menge von C.ELEGANTIOR gesammelt werden. Dabei gelang es, zwei Formen dieser Art zu erkennen, die sich in Gestalt und Farbe äußerlich sehr ähnlich waren, aber beim Betüpfeln mit KOH im Stielbasisfleisch deutliche Unterschiede aufwiesen.

C.ELEGANTIOR -typische Form- zeigte die übliche weinrote Farbreaktion mit der Lauge, dagegen verfärbte sich C.ELEGANTIOR -abweichende Form- olivbraun bis lebhaft rostbraun.Die beiden Formen wurden in Methanol eingelegt, dem Ascorbinsäure und einige Tropfen Salzsäure zur Zerstörung der Oxidasen zugesetzt wurden. Die Pilze wurden so frisch wie möglich aufgearbeitet.

1.1. C.ELEGANTIOR -typische Form

1.1.1. Der Pilz

M.Moser[1] beschreibt C.ELEGANTIOR als Pilz mit gelbem, olivgelbem, olivbraunem bis kastanienbraunem Hut. Die Lamellen sind wachsgelb bis olivbräunlich, das Fruchtfleisch blaßstrohgelblich, in der Basis hellrharbarberfarben.
Mit 4o-proz. KOH färbt sich das Fleisch der Stielbasis rosa bis weinrot.

1.1.2. Aufarbeitung der Pilze

Die in Methanol/Ascorbinsäure/HCl aufbewahrten Pilze wurden von der Farblösung abfiltriert, zerkleinert und erneut mit Methanol bedeckt stehengelassen. Die Farblösungen der vereinigten Extrakte wurden eingeengt und erschöpfend mit Essigester extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase ergab sich ein dunkelorangegelber Rohextrakt, der zum Entfetten mehrmals mit Petrolether 4o-6o° digiriert wurde.
Der Rohextrakt zeigte unter der UV-Lampe bei λ=366nm eine ungewöhnlich starke Fluoreszenz.

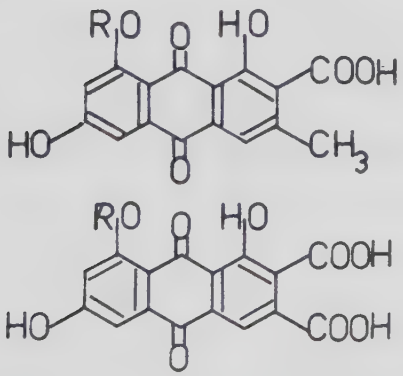
1.1.3. Isolierung der Anthrachinoncarbonsäuren

Zum Abtrennen von Anthrachinoncarbonsäuren wurde der Rohextrakt in Essigester gelöst und mit einem Phosphat-

puffer von pH =7[21] ausgeschüttelt.

Ansäuern der intensiv rotgefärbten, wäßrigen Phase und Zurückschütteln mit Essigester ergab das Säurenrohgemisch.

Mit Hilfe präparativer Dickschichtchromatographie (Kieselgel,'saures' Laufmittel*) wurden die vier Anthrachinoncarbonsäuren Endocrocin (18), Dermolutein (35), Cortinarsäure (33) und 8-Methylcortinarsäure (37) aufgetrennt und durch Vergleich mit authentischen Proben identifiziert[22].



18 R = H

35 R = CH_3

33 R = H

37 R = CH_3

1.1.4. Isolierung der Hauptpigmente

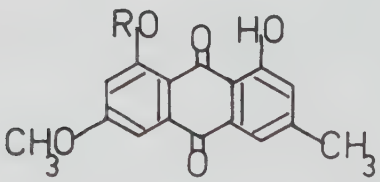
Die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Rohextrakts nach Abtrennung der Anthrachinoncarbonsäuren zeigte vier Substanzflecken: das grüngelbe Hauptpigment,

---

*) Das Laufmittel mit der Zusammensetzung Benzol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure=10/5/3 soll der Einfachheit halber 'saures' Laufmittel genannt werden.

ein blaßgelbes Pigment mit gleichem R_F-Wert, das im UV-Licht (λ=366nm) intensiv hellblaugrün fluoreszierte und zwei dicht beieinander laufende gelbe Nebenpigmente mit deutlich höheren R_F-Werten.

Die Isolierung der vier Substanzen erfolgte an acetyliertem Polyamid. Toluol und Toluol/Essigester im Verhältnis 3:2 eluierten die zwei Nebenpigmente, Toluol/Essigester 2:3 das blaßgelbe, fluoreszierende Pigment und reiner Essigester schließlich das gelbgrüne Hauptpigment.
Zu erwähnen sind außerdem zwei neutrale Anthrachinone, die in geringer Konzentration mit Petrolether-Toluol-Gemischen im Vorlauf auftraten.Sie konnten als Physcion (38) und Physcion-8-methylether (39) identifiziert werden.

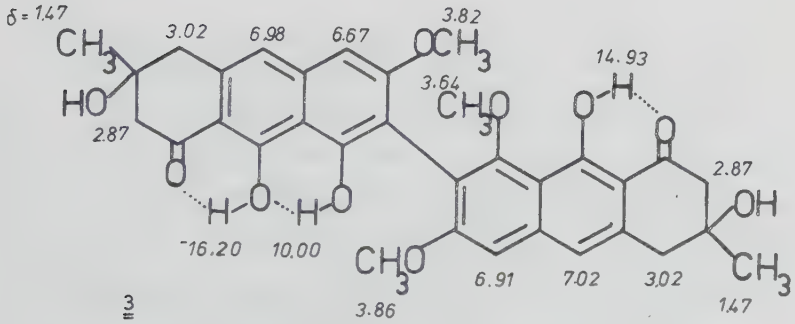


38 R = H

39 R = CH_3

Rechromatographie der Hauptpigmente und Kristallisation aus Petrolether/Essigester ergab reine, mikrokristalline Farbstoffe, die spektroskopisch untersucht wurden.

Das als grüngelbes, mikrokristallines Pulver anfallende Hauptpigment stellt nach seinen spektroskopischen Daten einen Flavomannin-6,6',8'-trimethylether (3) dar.
Das Massenspektrum mit den Ionen m/e 588 (M^+), 57o (M^+-H_2O) und dem prominenten Fragment 521 (M^+-$2H_2O$ -OCH_3) ist identisch mit den von Töpfer-Petersen[3] angegebenen Werten.
Die Signale im Aromatenbereich des NMR-Spektrums sind charakteristisch für Dimere vom Flavomannintyp: zwei scharfe Singuletts für H-5 bzw.H-5' und zwei verbreiterte Singuletts für H-1o bzw.H-1o', die eine Benzylkopplung mit der CH_2-Gruppe in 4-Stellung aufweisen. Die Zuordnung der drei OCH_3-Gruppen in 6,6' und 8'-Stellung resultiert aus der Lage der chelatisierten OH-Gruppen: δ =9,96 und 16,1o ppm für die Hydroxygruppen an C-8 und C-9, und δ = 14,87 ppm für die der Methoxygruppe benachbarten 9'-Stellung.

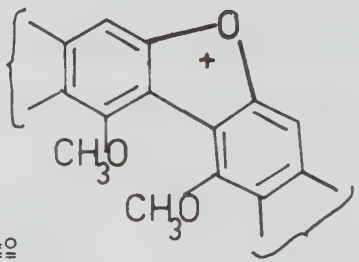


3

Auch die UV- und IR-Spektren stimmen mit den bereits beschriebenen Werten überein.

1.1.5. Strukturaufklärung der beiden gelben Nebenpigmente und des Fluoreszenzstoffes.

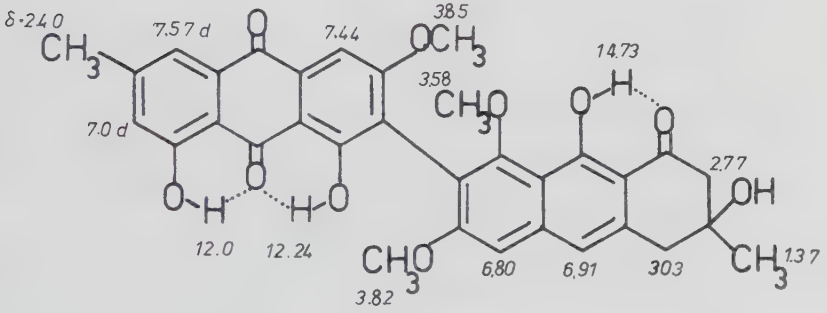
Nach ihren Massenspektren mit m/e 584 (M^+ $C_{33}H_{28}O_{10}$) sind die beiden gelben Nebenpigmente isomer. In beiden Fällen spaltet sich ausgehend vom schwachen Molpeak Wasser und eine Methoxygruppe zum stabilen Ion m/e 535 ab, dem nach Töpfer-Petersen[3] die für 7,7'-verknüpfte Dimere charakteristische Dibenzofuranstruktur 4o zugeordnet werden kann.



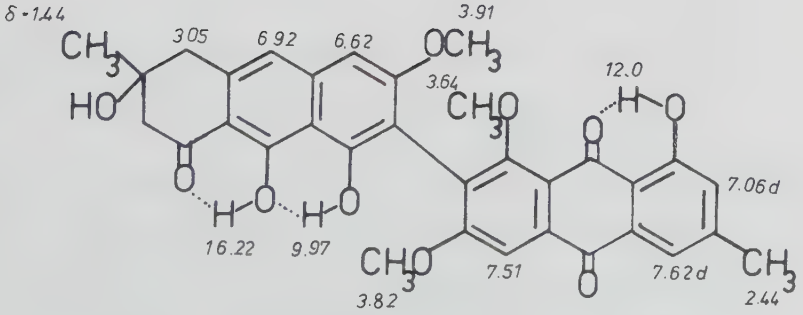
4o

In ihren NMR-Spektren ist jeweils eine Hälfte des Flavomannin-6,6',8'-trimethylethers zu sehen, die anderen Signale gehören zu Anthrachinonhälften. Dieses wird unter anderem durch die charakteristischen Signale der chelatisierten Hydroxygruppen bei δ =16,22; 9,97 und 12,oo, bzw. bei 14,73; 12,24 und 12,oo ppm angezeigt. Die Anthrachinonsignale der beiden Verbindungen stimmen mit

denen von Physcion (38) bzw. Physcion-8-methylether (39) überein, so daß sich für die gelben Nebenpigmente die Strukturen eines Anhydroflavomannin-9,1o-chinon-6,6',8'-trimethylethers (41) und eines Anhydroflavomannin-9',1o'-chinon-6,6',8'-trimethylethers (42) ergeben.
Das Auftreten eines Anhydroflavomannin-9,1o-chinons neben dem Hauptpigment Flavomannin-6,6'-dimethylether wird auch bei D.CINNAMOMEALUTEA beobachtet[5].



41



42

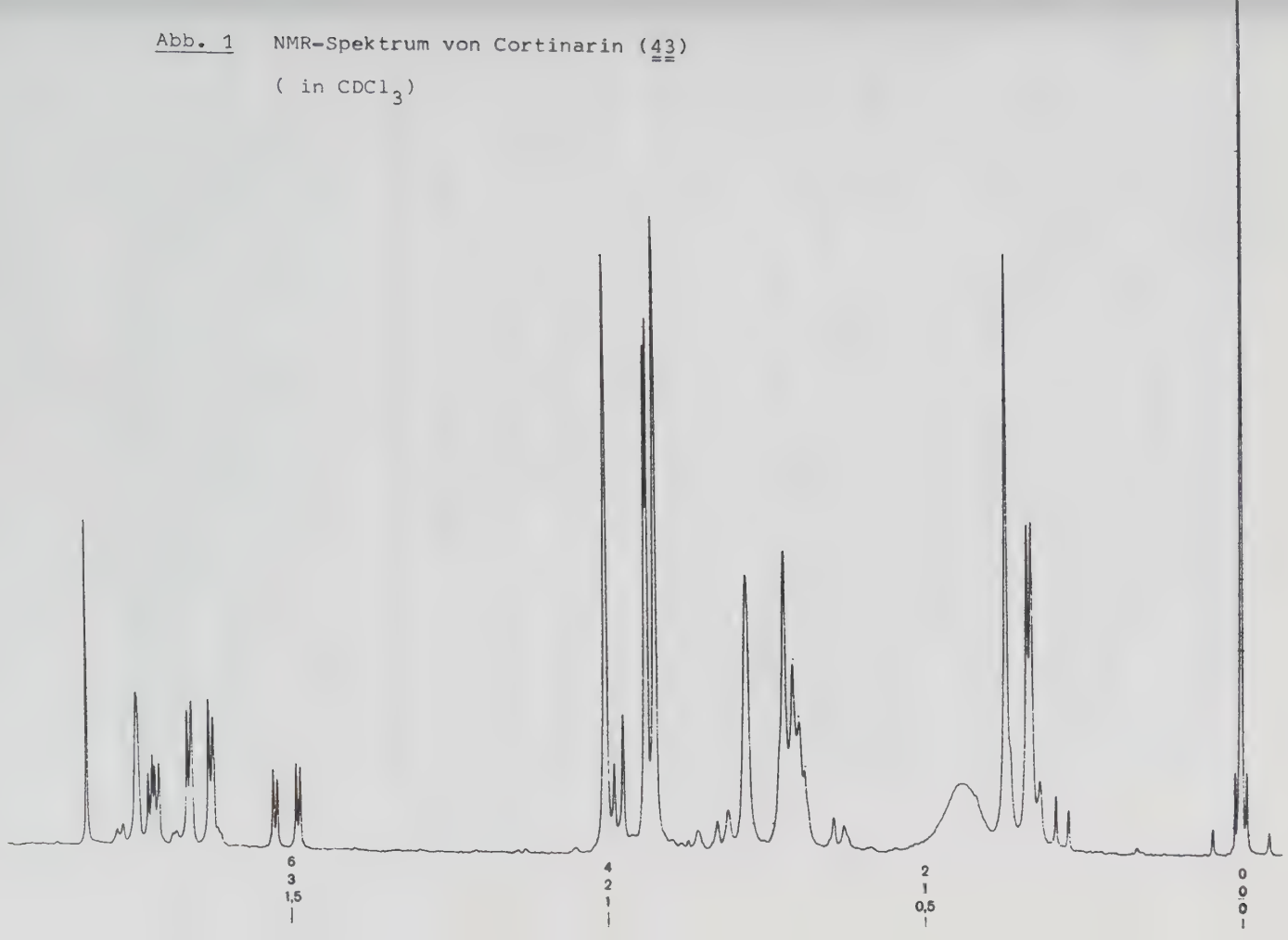
Das blaßgelbe, fluoreszierende Pigment läßt sich aus Petrolether/Essigester als kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt von 192 °C ausfällen.
Sein chromatographisches Verhalten und seine Farbe weisen große Ähnlichkeit mit Flavomannintrimethylether auf. Die R_F-Werte der beiden Verbindungen sind exakt gleich, so daß man nur mit Hilfe der UV-Lampe (λ =366 nm) die beiden Substanzen unterscheiden kann. Aus diesem Grund wird man vermutlich bei früheren Untersuchungen von C.ELEGANTIOR dieses fluoreszierende Pigment, das wir Cortinarin nennen wollen, übersehen haben.

Nach der aus dem hochaufgelösten Massenspektrum ermittelte Zusammensetzung $C_{33}H_{32}O_{1o}$ ist die neue Verbindung isomer mit dem Hauptpigment. Das Fragmentierungsverhalten ist jedoch deutlich verschieden:
Nach zwei Wasserabspaltungen ausgehend von m/e 588 (M^+) zu 57o und 552 erfolgt sofort der Zerfall in die Monomeren m/e 298 und 284. Es tritt nicht das für 7,7'-Dimere typische Dibenzofuran m/e 521 auf (4o).

Mit Hilfe der Signale im Aromatenbereich des NMR-Spektrums sollte die Verknüpfungsart der beiden monomeren Hälften schnell zugänglich sein.
Das Spektrum von Cortinarin (Abb. 1) zeigt im Bereich zwischen 5,9 und 7,o ppm vier Dubletts mit J = 2,5Hz, außerdem zwei Dubletts mit J = 2,5Hz und ein verbreitertes Singulett mit doppelter Intensität. Auf den ersten Blick hätte man annehmen können, daß es sich um ein Gemisch aus

Abb. 1 NMR-Spektrum von Cortinarin (43)

(in $CDCl_3$)



zwei verschiedenen Verbindungen handeln sollte. Entkopplungsversuche zeigten jedoch, daß ein Isomeren-Gemisch im Verhältnis 1:1 vorliegt, bei dem ein Teil der Signale einen deutlichen Unterschied in den chemischen Verschiebungen aufweist. 2,5-Hz-Dubletts bei δ= 5,91 und 6,o5 bzw. bei 6,78 und 6,83 ppm haben jeweils gemeinsame Kopplungspartner bei 6,6o (d, $\underline{J}$ =2,5Hz, 2H) bzw. bei 6,44 ppm (d, J =2,5Hz, 2H).

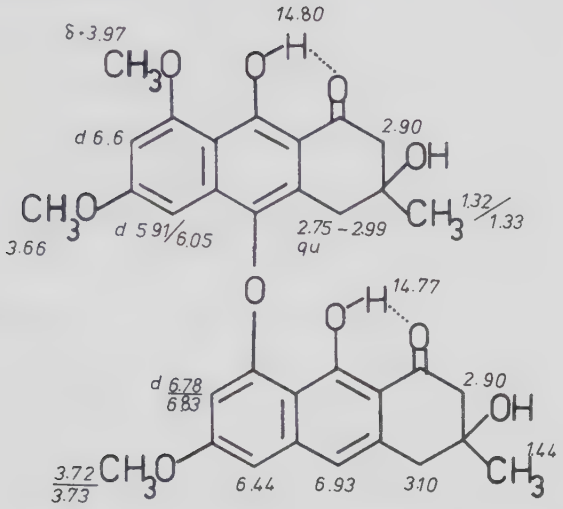
Demnach liegen zwei isomere Formen einer Verbindung vor, die vier meta-ständige Protonen besitzt und ein Proton in Nachbarschaft zu einer CH_2-Gruppe, da sein NMR-Signal bei δ=6,93 ppm durch benzylische Kopplung verbreitert ist.

Im Vergleich mit dem Modell Flavomannin lassen sich nun folgende Strukturelemente herleiten: einer Anthracenhälfte werden die 5- und 7- Protonen mit der entsprechenden Meta-Kopplung zugeordnet, die 1o-Stellung soll substituiert sein. Die zweite Molekülhälfte besitzt alle drei Aromatenprotonen H-5', H-7' und H-1o'.

Die Dimerisierung kann also nur durch Verknüpfung von C-1o mit einem der phenolischen Sauerstoffatome erfolgt sein.

Die Lage der drei OCH_3-Gruppen - δ= 3,66; 3,73 und 3,97 ppm - im Vergleich zu den Daten von Phlegmacin-trimethylether aus C.PERCOMIS[1o)] und der beiden chelatisierten Hydroxygruppen bei 14,78 bzw. 14,8o ppm sind weitere Argumente für den Strukturvorschlag $\underline{\underline{43}}$ für

Cortinarin.



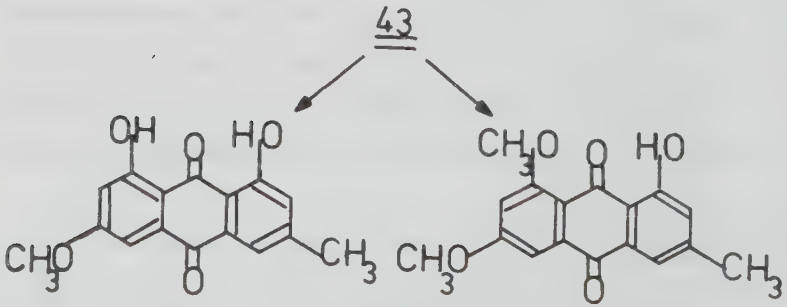
43

Wie im Phlegmacin (9) wird auch bei diesem Diarylether durch den sterischen Einfluß der zweiten Molekülhälfte die CH_2-Gruppe in 4-Stellung zu einem AB-Quartett mit J = 17Hz aufgespalten, die anderen CH_2- Gruppen erscheinen im NMR-Spektrum als verbreiterte Siguletts.

1.1.5.1. Alkalische Oxidation von Cortinarin.

Als weiteren Strukturbeweis kann die alkalische Oxidation des Pigments angesehen werden.
Löst man das fluoreszierende Pigment in 5-proz. Natronlauge, so verfärbt sich die Lösung sofort dunkelrot.

Das Reaktionsgemisch wird kurzzeitig erhitzt, angesäuert und mit Essigester ausgeschüttelt. Das DC der Lösung zeigt quantitative Umsetzung zu zwei gelben Produkten, die als Physcion (38) und Physcion-8-methylether (39) identifiziert werden können.
Die oxidative Spaltung zu diesen erwarteten Anthrachinonen läuft bereits bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten ab.
Im Vergleich dazu, wird Flavomannin-6,6',8'-trimethylether erst nach alkalischer Oxidation zum entsprechenden Bianthrachinon durch Erhitzen mit Dithionit in die Anthrachinonhälften gespalten.
Als Erklärung für diese für Diarylether erstaunlich milden Spaltungsbedingungen kann man die große Oxidationsempfindlichkeit der Dihydroanthrachinon-Teilstruktur ansehen.

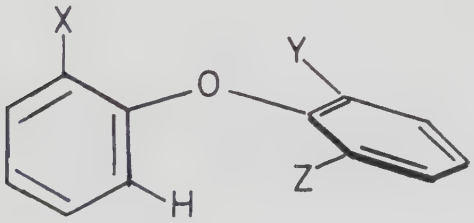


38 39

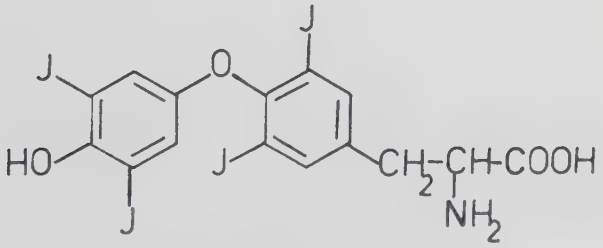
1.1.6. Diskussion der Stereoisomeren des Cortinarins

1.1.6.1 Konformation sterisch gehinderter Diarylether.

Konformationsuntersuchungen an zwei- bzw. dreifach substituierten Diarylethern haben ergeben, daß sie bevorzugt eine 'H-inside'-Konformation einnehmen[23].

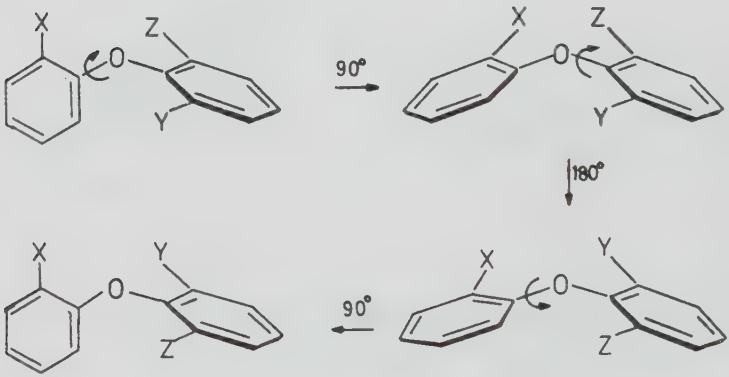


Bei natürlich vorkommenden Diarylethern wie z.B. beim Thyroxin (44)[24] konnte diese Konformation nachgewiesen werden.



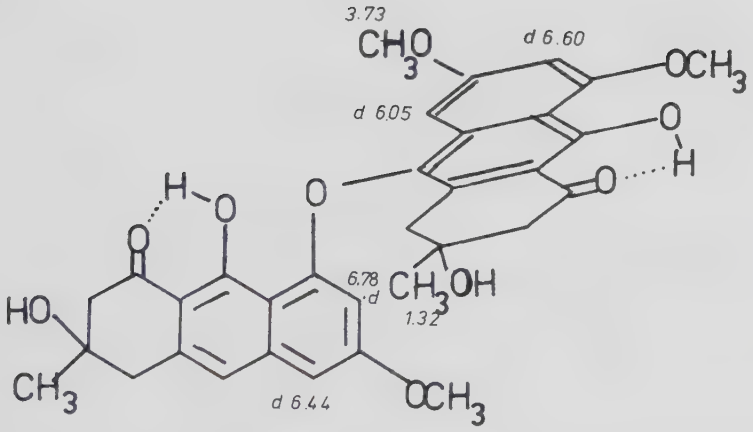
44

Entsprechend substituierte Biphenylether sind dissymmetrisch und sollten bei ausreichend hoher Energiebarriere für die Rotation um die Ar-O-Bindung in die Isomeren trennbar sein.
Als Mechanismus für die Überführung der beiden stabilen Konformere bei dreifach ortho-substituierten Ethern wurde eine Ringrotation in drei Schritten vorgeschlagen, die über zwei 'Schmetterling'-Zwischenstufen I und II ablaufen soll[25].

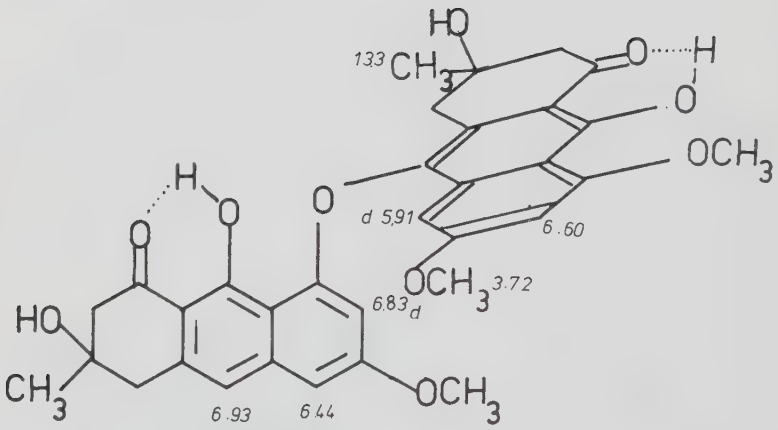


Überträgt man nun dieses Modell auf den Diarylether Cortinarin, so kann man für die beiden im NMR-Spektrum erkennbaren Isomeren ebenfalls zwei 'H-inside'-Konformationen formulieren.
Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der betrof-

fenen Protonen wurde mit Hilfe eines Dreiding-Modells versucht.



43 - 1


HO
1.33 CH3
O
H
O
OCH3
H
O
O
O
d 5,91
6.60
OCH3 3.72
6.83 d
HO
CH3
6.93
6.44
OCH3

43 - 2

1.1.6.2. Bestimmung der Rotationsbarriere durch Koaleszenzmessung

Die Geschwindigkeit der thermischen Umwandlung zweier Isomere wird durch die freie Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\ddagger}$ bestimmt. Ist $\Delta G^{\ddagger} \approx 96$ KJ (23Kcal)/mol, so sind die Isomeren bei Raumtemperatur stabil und auch voneinander trennbar, bei niedrigeren $\Delta G^{\ddagger}$-Werten erfolgt eine mehr oder weniger rasche Isomerisierung.
Mit Hilfe der temperaturabhängigen NMR-Spektroskopie läßt sich die Koaleszenztemperatur, d.h. die Temperatur, bei der zwei Signale gerade zusammenfallen, bestimmen. Nach der Eyring-Gleichung hängt $\Delta G^{\ddagger}$ von der Koaleszenstemperatur T_c und der Geschwindigkeitskonstante am Koaleszenzpunkt k_c ab.

$$\Delta G^{\ddagger} = 4.57\ T_c\ (10.32 + \log \frac{T_c}{k_c}) \cdot 10^{-3}\ \frac{Kcal}{mol}$$

K_c wird nach der Gleichung

$$k_c \approx = \pi \Delta \nu / \sqrt{2}$$

berechnet, wobei $\Delta \nu$ den Frequenzunterschied (Hz) angibt.

Die Hochtemperaturmessung von Cortinarin (in DMSO-d_6) ergab einen Koaleszenz bei 168°C. Bei dieser Temperatur fielen die Signale bei δ= 5.91 und 6.05 ppm zusammen. Die daraus berechnete freie Aktivierungsenthalpie beträgt 96.8 KJ (23.1 Kcal)/mol.

Demnach sollten die beiden Isomeren bei Raumtemperatur stabil und auch trennbar sein. Aber obwohl auf dem DC (Kieselgel,'saures Laufmittel') eine Einschnürung des Substanzflecks zu erkennen war, ließ sich bisher, selbst mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie, eine chromatographische Auftrennung der Konformere von Cortinarin nicht erreichen.

Abb.2 zeigt die Temperaturabhängigkeit des ^{1}H-NMR-Spektrums von Cortinarin anhand der Aromatensignale und ihrer Veränderungen bei den verschiedenen Temperatureinstellungen.

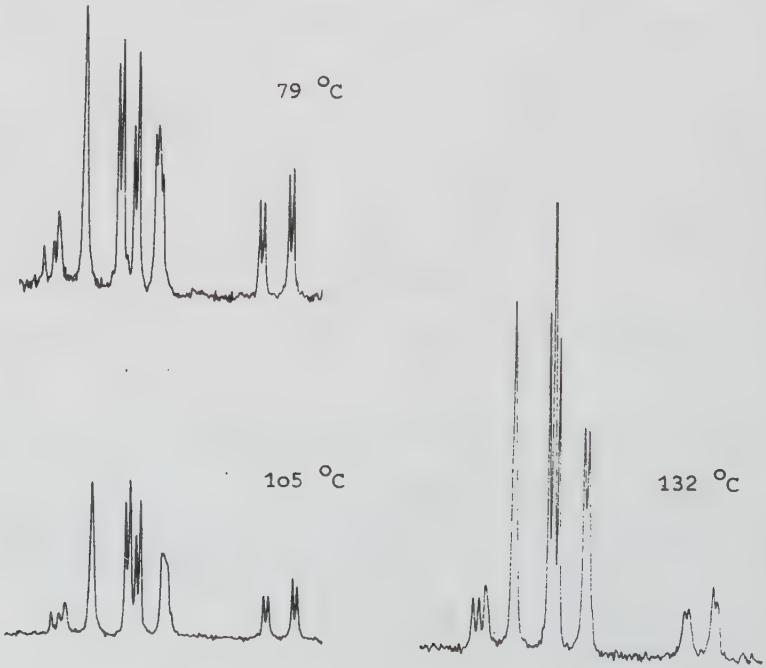
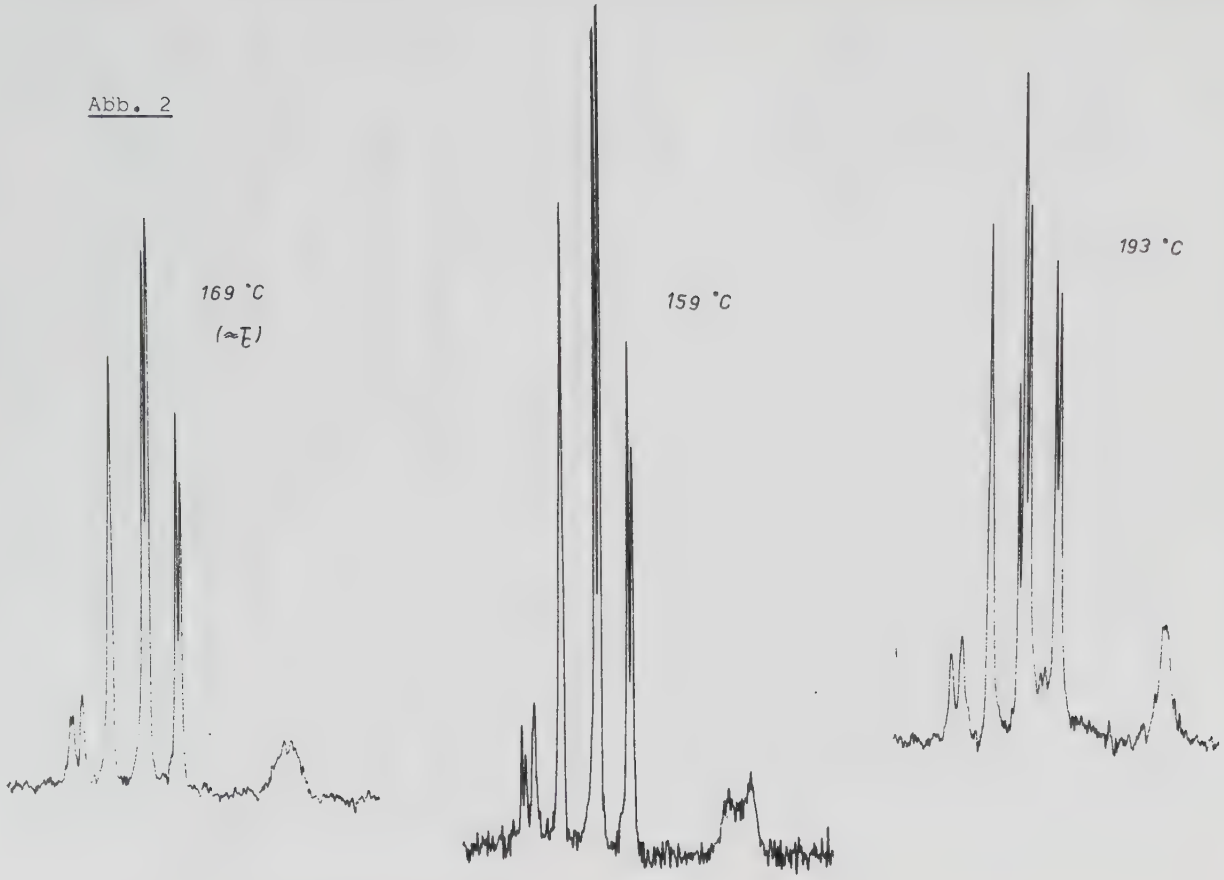


Abb. 2



1.2. C.ELEGANTIOR - abweichende Form

1.2.1. Der Pilz

Die Pilze weisen nur geringe morphologische Unterschiede zum typischen C.ELEGANTIOR auf. So ist z.B. der Hut kaum, bei C.ELEGANTIOR dagegen kräftig eingewachsen.
Deutliche Unterschiede zeigt die abweichende Form aber in ihrer Pigmentierung: Kupferbraune Schuppen, grünlich-gelbe Lamellen, ein nur an der Rinde oliv-gelbliches Stielfleisch und vorallem eine etwas uncharakteristische braune Laugenreaktion[27].

1.2.2. Aufarbeitung der Pilze

Die Aufarbeitung der in Methanol/Ascorbinsäure/HCl aufbewahrten Pilze ergab einen dunkelgelben Rohextrakt, der, im Vergleich zu C.ELEGANTIOR (typische Form) keine Fluoreszenz aufwies.
Nach erster chromatographischer Untersuchung enthielt der Rohextrakt nur zwei Produkte: ein grüngelbes Hauptpigment und ein gelbes Nebenpigment mit deutlich höherem R_F-Wert. Es konnten weder neutrale Anthrachinone noch die für C.ELEGANTIOR (typische Form) charakteristischen Anthrachinoncarbonsäuren nachgewiesen werden. Lediglich Spuren von Endocrocin (18) konnten durch Ausschütteln mit dem Phosphatpuffer mit pH=7 abgetrennt werden.

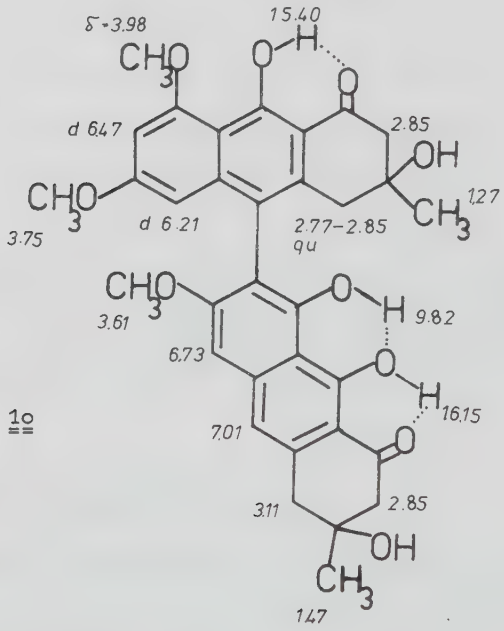
1.2.3. Isolierung und Identifizierung der Pigmente

Das Farbstoffrohgemisch wurde wie von Töpfer-Petersen[3] beschrieben, an acetyliertem Polyamid chromatographiert. Dabei eluierte Toluol/Essigester das gelbe Nebenpigment und Essigester das gelbgrüne Hauptpigment.
Beide Farbstoffe wurden an acetyliertem Polyamid rechromatographiert.

Das aus Essigester/Petrolether als hellgelbes Pulver ausfallende Hauptpigment konnte nach seinen spektroskopischen Daten als Phlegmacin-8'-methylether(10) identifiziert werden.
Mit seiner durch hochaufgelöstes MS ermittelte Zusammensetzung $C_{33}H_{32}O_{10}$ ist Phlegmacinmethylether isomer mit Flavomannintrimethylether und mit Cortinarin.
Interessanterweise sind auch sein chromatographisches Verhalten und seine Farbe sehr ähnlich, so daß ein Identifizieren der drei Trimethylether aus den beiden C.ELEGANTIOR-Formen durch einfaches Vergleichen der R_F-Werte nicht möglich ist.
Auch die sehr ähnlichen UV- und IR-Spektren lassen keine eindeutige Unterscheidung der drei Isomere zu.

Ein sicherer Indikator ist das NMR-Spektrum (in $CDCl_3$), in dem die Signale im Aromatenbereich , zwei Singuletts bei δ = 7.01 (s,breit) bzw 6.78 (s) und zwei Dubletts (J =2.5Hz) bei 6.47 und 6.21 ppm, auf die 7,1o'-Ver-

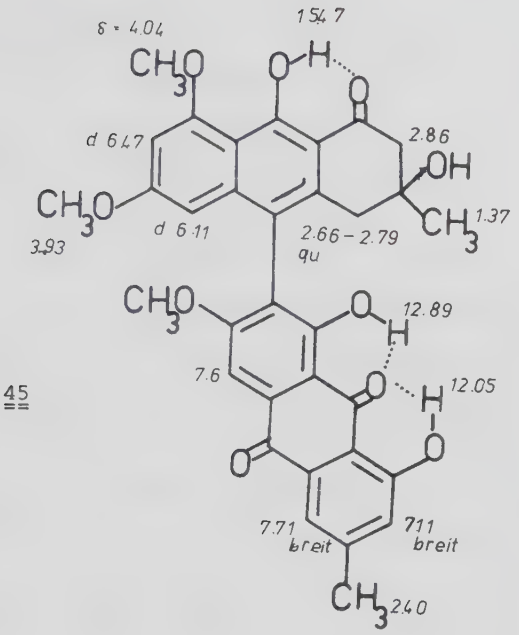
knüpfung der beiden Monomerenhälften hinweisen.



1o

Das gelbe Nebenpigment stellt nach seinen spektroskopischen Eigenschaften einen Anhydrophlegmacin-9,1o-chinon-8'-methylether dar (45).

Alle Meßwerte (UV,MS,NMR und IR) stimmen mit den von Töpfer-Petersen[3] beschriebenen Werten überein.



45

1.2.4. Vergleich der beiden Formen von C.ELEGANTIOR

Aufgrund der Ergebnisse der neuen Aufarbeitung kann man nun eindeutig sagen, daß das färbende Prinzip von C.ELEGANTIOR ein Pigment vom Flavomannintyp ist. Der von Töpfer-Petersen als Hauptpigment beschriebene Phlegmacin-8-methylether kann einem Pilz zugeschrieben werden, der äußerlich C.ELEGANTIOR sehr ähnlich ist und leicht mit ihm verwechselt werden kann.

Chemotaxonomisch sind die beiden Formen von C.ELEGANTIOR

deutlich zu unterscheiden, und es bleibt abzuwarten, ob die abweichende Form auch aufgrund morphologischer Unterschiede als eigene Art eingeordnet werden kann.*)

1.2.5. Zur Stereochemie der Phlegmacien-Pigmente

Alle bisher vorgestellten Pigmente vom Tetrahydroanthracentyp besitzen in 3- bzw. 3'-Stellung ein Chiralitätszentrum; außerdem tritt aufgrund der behinderten Rotation um die Biarylbindung Atropisomerie auf. Vergleicht man die Drehwerte von 7,7'-Biphyscion (21) $[\alpha] = -64o^{\circ}$ und von Flavomannin-6,6'-dimethylether (4) $[\alpha] = -1o9o^{\circ}$ [5], so wird offensichtlich, daß der Einfluß der Biphenylisomerie auf die optische Drehung sehr groß sein muß, da im Bianthrachinon kein asymmetrisches C-Atom vorhanden ist.
Neben der Drehwertmessung bietet sich zur Charakterisierung der optisch aktiven Verbindungen die Optische Rotationsdispersion ORD und der Circulardichroismus CD.

In einer ORD-Kurve wird die Abhängigkeit des Drehwinkels α von der Wellenlänge dargestellt. Im Fall einer 'normalen' ORD-Kurve erhält man dabei für kleinere Wellenlängen stets größere Absolutwerte.
Bei Wellenlängen im Bereich von Absorptionsbanden ist jedoch nicht nur die Fortpflanzungsgeschwindigkeit von

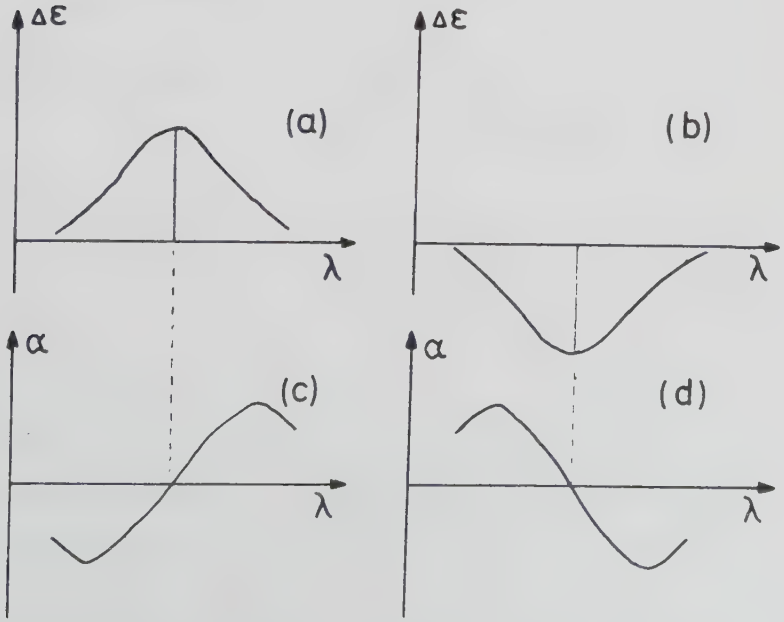
*) Nach einer persönlichen Mitteilung von Prof.M.Moser kann es sich bei 'C.ELEGANTIOR-abweichende Form' um C.FULGENS handeln.

links- und rechtscircularpolarisiertem Licht unterschiedlich, es werden auch beide Lichtstrahlen verschieden stark absorbiert. Dieses Phänomen, der Circulardichroismus, wird in einer Kurve dargestellt, in der die Differenz der Absorptionskoeffizienten $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{links} - \varepsilon_{rechts}$ gegen die Wellenlänge aufgetragen wird.

Das CD ist nur im Bereich der Absorptionsmaxima meßbar. Mißt man die Optische Rotationsdispersion in diesem Bereich, so wird die 'normale' ORD-Kurve durch den Einfluß des CD von einer S-förmigen Kurve zur 'anomalen' ORD-Kurve überlagert.

Beide Phänomene -anomale ORD und CD- bezeichnet man als Cotton-Effekt.

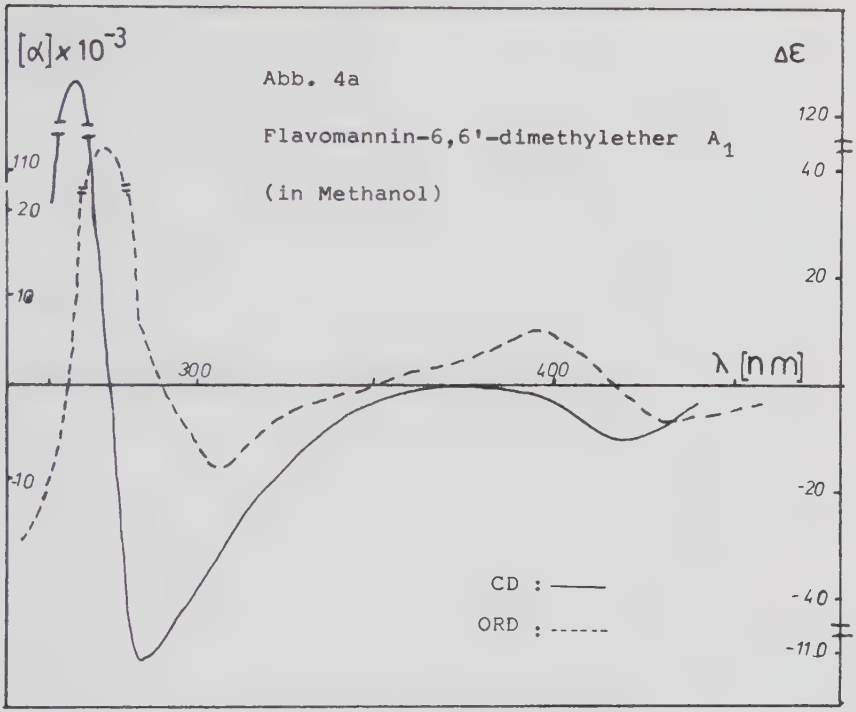
Abb. 3 ORD- und CD-Kurven im Bereich einer Absorptionsbande[28)]

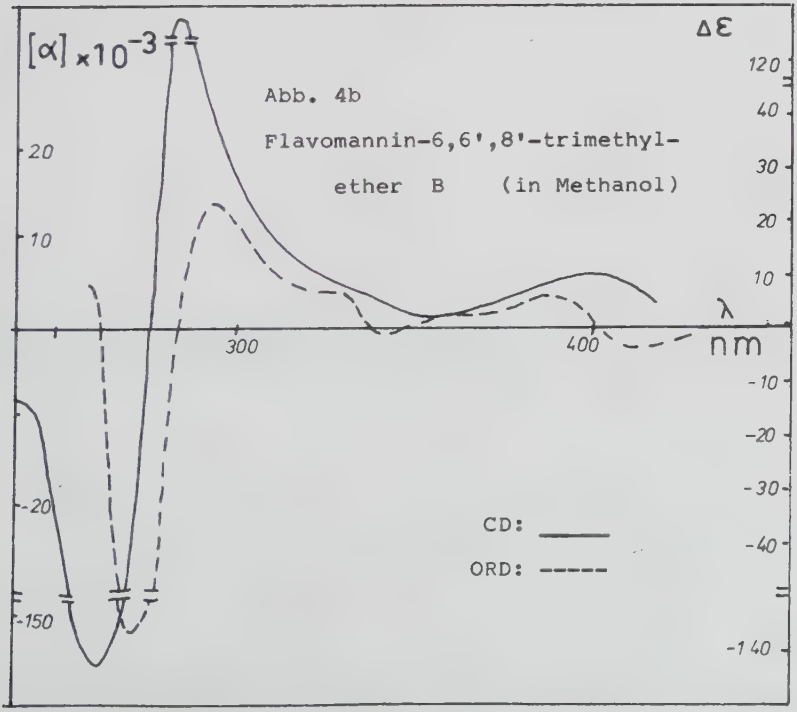


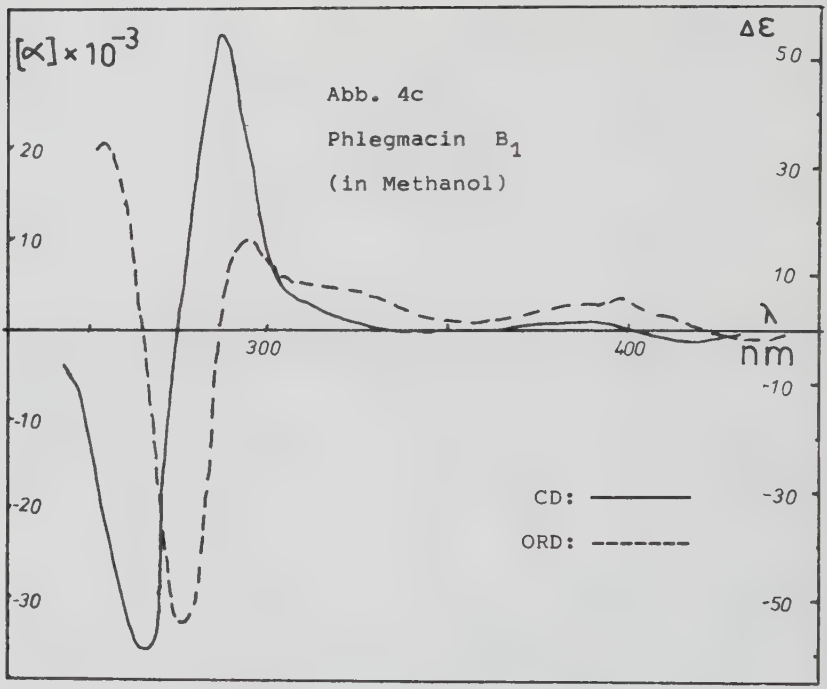
Definitionsgemäß soll nun ein positiver Cotton-Effekt charakterisiert sein durch ein positives Maximum der CD-Kurve und einer ORD-Kurve, in der von großen nach kleinen Wellenlängen betrachtet, zunächst ein Gipfel und dann ein Tal erreicht wird. In der Abbildung 3 stellen also Fall a und c einen positiven Cotton-Effekt, Fall b und d einen negativen Cotton-Effekt dar.

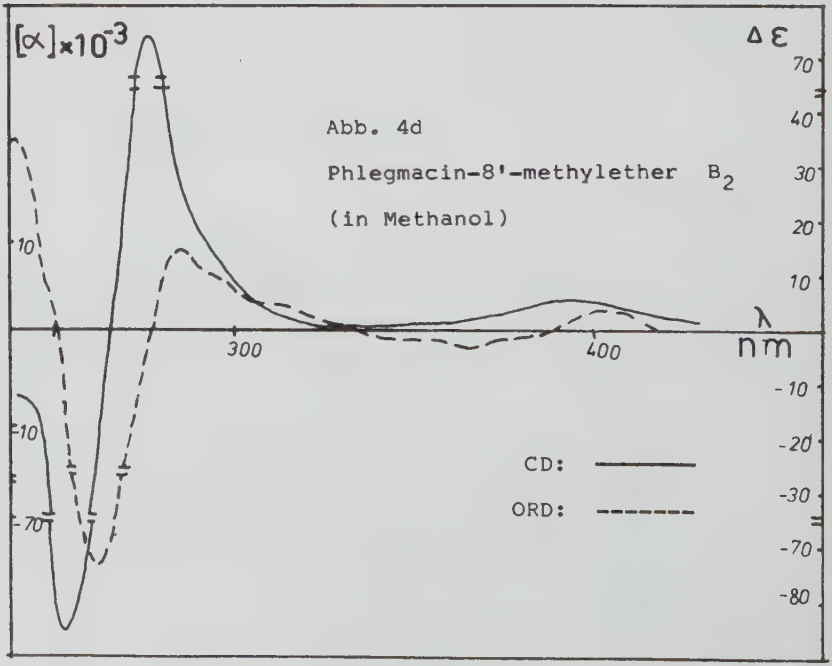
Im Folgenden sollen die ORD- und CD-Kurven der Phlegmacien-Pigmente miteinander verglichen werden.
Alle Pigmente zeigen im Bereich zwischen 27o und 3oo nm den für Atropisomere charakteristischen starken Cotton-Effekt.
Es sollen Verbindungen mit positivem Cotton-Effekt mit B, mit negativem Effekt mit A und Racemate mit C bezeichnet werden. Die von Steglich und Töpfer-Petersen[4)] zunächst in umgekehrter Reihenfolge angegebene Zuordnung wird aufgrund der oben dargestellten Definition umgestellt. Die Nomenklatur der bisher beschriebenen Pigmente bleibt dadurch erhalten. (Abb.4)

Mit Hilfe der ORD-und CD-kurven lassen sich dimere Verbindungen in Bezug auf ihre absolute Konfiguration an der Biarylbindung vergleichen. Über die relative und absolute Konfiguration der sp^3-Zentren kann man aber bisher nichts aussagen. Die sich durch Unterschiede in der Konfiguration der sp^3-Zentren ergebenden Stereoisomeren werden in der Reihenfolge ihrer Isolierung mit fortlaufenden Indices nummeriert (z.B. Flavomannin-6,6'-dimethylether A_1 (Abb.4a)


[α] x 10⁻³
Δε
Abb. 4a
Flavomannin-6,6'-dimethylether A1
(in Methanol)
110
20
10
300
400
λ [nm]
120
40
20
-10
-20
-40
-110
CD : ——
ORD : ------

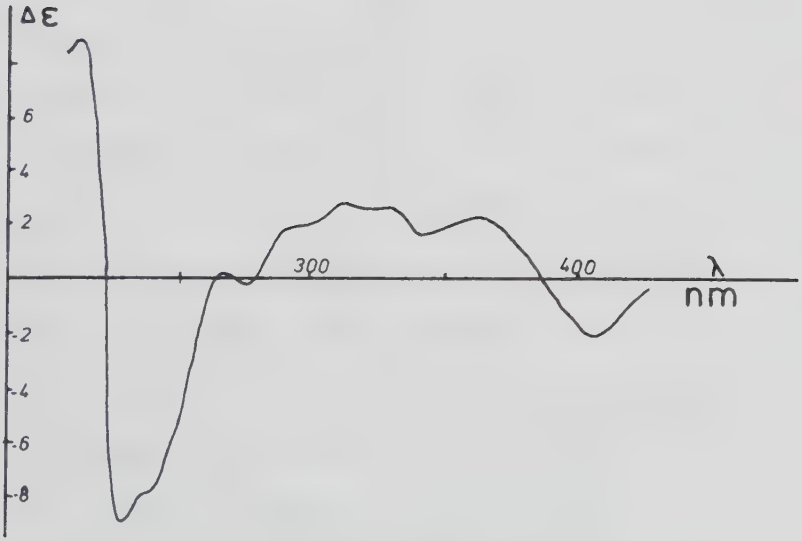

[α] x10⁻³
Δε
Abb. 4b
Flavomannin-6,6',8'-trimethyl-
ether B (in Methanol)
20
10
300
400
λ
nm
120
40
30
20
10
-10
-20
-30
-40
-140
-150
CD: ——
ORD: -----


[α]×10⁻³
Δε
Abb. 4c
Phlegmacin B1
(in Methanol)
20
10
-10
-20
-30
50
30
10
-10
-30
-50
300
400
λ
nm
CD:
ORD:


[α]×10⁻³
Δε
Abb. 4d
Phlegmacin-8'-methylether B2
(in Methanol)
10
-10
-70
70
40
30
20
10
-10
-20
-30
-70
-80
300
400
λ
nm
CD:
ORD:

Auch Cortinarin (43) sollte aufgrund der sterischen Hinderung der Rotation um die Aryl-O-Bindung eine Konformations-Chiralität aufweisen. Da aber die Auftrennung in die Isomeren nicht möglich war, konnte nur das Gemisch vermessen werden. Die CD-Kurve (Abb.5) zeigt dementsprechend im Bereich von 27o-3oo nm einen flachen Verlauf. Die weitere Kurvenform, vorallem im Bereich von 4oo-45o nm, und der Drehwert von $[\alpha]^{2o}_{546} = -11^{\circ}$ wird durch die Chiralitätszentren an C-3 bzw. C-3' bestimmt.

Abb.5 CD-Kurve von Cortinarin



2. Die Pigmente aus C.ATROVIRENS (Kalchbr)

2.1. Der Pilz

Nach Moser[1] ist C.ATROVIRENS, der Schwarzgrüne Klumpfuß, ein Pilz mit dunkelolivgrünem bis schwarzgrünem Hut. Die für ihn charakteristische grüne Farbe setzt sich am Stiel bis zur Knolle fort. Auch das Fruchtfleisch ist durchgehend intensiv hellgrüngelb gefärbt. Als Standort für den sehr seltenen Pilz wird Nadelwald, besonders Bergnadelwald angegeben.

2.2. Aufarbeitung der Pilze

Zu Verfügung standen neben gefriergetrockneten Pilzen vier frische Fruchtkörper, die sofort aufgearbeitet werden konnten. Der Vergleich der beiden Aufarbeitungen zeigte deutlich, daß sich aus den gefriergetrockneten Pilzen die Pigmente mit Aceton nur sehr unvollständig herauslösen ließen, während das frische Material mit Aceton sofort eine intensiv gelbgrüne Farblösung ergab, die auch auf dem DC ein wesentlich einheitlicheres Bild bot. Es zeigten sich vier grüne Substanzflecken, die nach steigendem R_F-Wert Grün 1, Grün 2, Grün 3 und Grün 4 genannt wurden, und ein schwächerer orangeroter mit deutlich höherem R_F-Wert. Die zusätzlichen roten und gelben Substanzen des Rohextrakts der gefriergetrockneten Pilze traten hier nicht auf, so daß man sie als Artefakte ansehen kann.

Es empfiehlt sich für C.ATROVIRENS, wie wohl für alle Phlegmacien-Arten, die Pilze so frisch wie möglich aufzuarbeiten, da durch die Gefriertrocknung und auch durch die längere Lagerung wahrscheinlich eine Komplexierung der Pigmente mit der Zellsubstanz eintritt, die die Extraktion erschwert. Außerdem kann die Bildung von Artefakten weitgehend vermieden werden. Für die Aufbewahrung und gleichzeitige schonende Extraktion der Pilze hat sich ein Gemisch aus Methanol, Ascorbinsäure mit etwas Salzsäure, wie bei C.ELEGANTIOR beschrieben, bewährt.

2.3. Isolierung der Pigmente

Die Rohextrakte (mit Aceton bzw. Methanol/Ascorbinsäure/HCl) der beiden Aufsammlungen wurden an Sephadex LH 2o mit Methanol chromatographiert. Dabei trennten sich nacheinander drei grüngelbe Zonen ab, die als Fraktion1, 2 und 3 aufgefangen wurden.
Danach wurde als Fraktion 4 eine orangerote Zone eluiert.
Bei der Chromatographie des gefriergetrockneten Materials erhielt man anschließend noch eine gelbe Fraktion 5 und eine rote Fraktion 6.
Die einzelnen Fraktionen wurden rechromatographiert und spektroskopisch untersucht.

2.4. Strukturaufklärung des Pigments Grün 4- Atrochryson

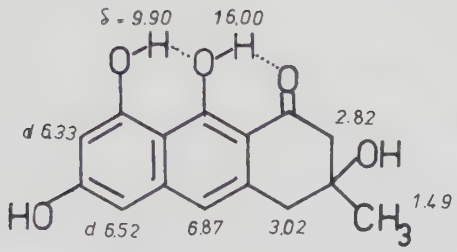
Aus Fraktion 1 erhielt man nach Rechromatographie an acety-

liertem Polyamid mit Toluol/Essigester (1:9) und Kristallisation aus Essigester/Petrolether das hellgrüngelbe mikrokristalline Pigment Grün 4, das Atrochryson genannt werden soll.
Atrochryson löst sich gut in Methanol oder Aceton, weniger gut in unpolareren Lösungsmitteln wie Chloroform und Toluol.

Interessanterweise zeigt das Massenspektrum dieses Pigments einen Molpeak M^+ m/e 274 mit der durch Hochauflösung ermittelten Zusammensetzung $C_{15}H_{14}O_5$. Es hat demnach keine dimere Struktur, was nach der Ähnlichkeit seiner Farbe und seines chromatographischen Verhaltens mit den bereits bekannten Phlegmacien-Pigmenten erwartet wurde.

Aus dem NMR-Spektrums (in Aceton-d_6) mit den Signalen einer CH_3-Gruppe bei δ=1.49(s), zweier CH_2-Grupen bei 2.82(s,br) bzw. 3.o2(s,br) und chelatisierter OH-Gruppen bei 9.9o bzw 16.oo ppm, kann jedoch wieder auf ein Tetrahydroanthracensystem geschlossen werden, dessen Aromatenprotonen bei 6.87(s,br), 6.52(d,J =2.5Hz) und 6.33 ppm(d) erscheinen.

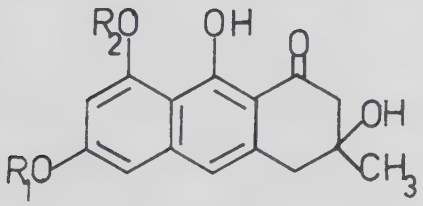
Die aufgrund dieser Daten vorgeschlagene Struktur eines 3,6,8,9-Tetrahydroxy-3-methyltetrahydroanthracen-1-ons(19) kann als monomere Schlüsselverbindung der Phlegmacien-Pigmente angesehen werden.



19

Die Struktur dieses Pigments konnte durch alkalische Oxidation zu Emodin (20) bestätigt werden.

Aus CASSIA TOROSA, einer Leguminosenart, isolierte Takido[29] ebenfalls ein Tetrahydroanthracenderivat, Torosachryson (46).
Es unterscheidet sich von dem aus C.ATROVIRENS isolierten Pigment durch eine zusätzliche Methoxygruppe an C-6.
Bereits 1972 wurde das in 8-Stellung methylierte Asperflavin (47) in Kulturen von ASPERGILLUS FLAVUS [30] nachgewiesen.



46 $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$

47 $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$

In ihren spektroskopischen Daten sind die drei 'Monomeren' sehr ähnlich.
Vergleicht man z.B. die UV-Daten, so erkennt man stets den Chromophor eines 1,8-Dihydroxynaphthalins in Konjugation zu einer Carbonylgruppe.

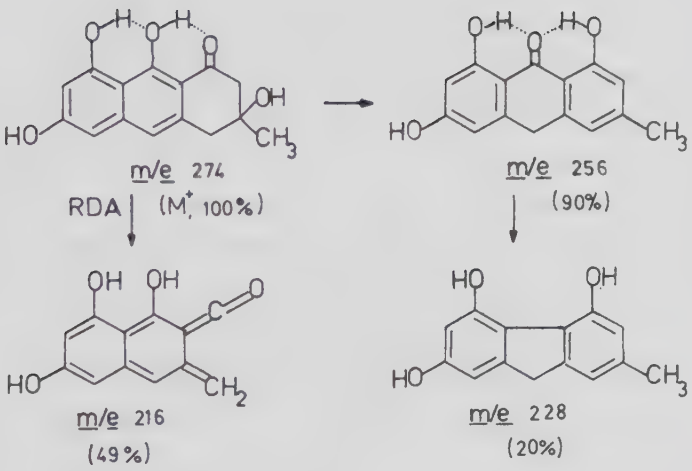
Tabelle der UV-Daten λ_{max} (log ε)

46	47	19	Musizin*)
	23o(4.11)	226(4.11)	225(4.54)
271(4.61)	269(4.61)	263(4.39)	263(4.27)
3o5(3.57)			3o3(3.79)
314(3.65)	317(3.65)	321(3.57)	
328(3.51)	335(3.4o)	335(3.49)	345(3.8o)
39o(3.89)	392(3.91)	397(3.89)	4o3(3.44)

*) 2-Acetyl-1,8-dihydroxy-3-methylnaphthalin[31]

Die typischen Fragmente im Massenspektrum von Atrochryson lassen sich nach dem für Asperflavin bzw. Torosachryson vorgeschlagenen Zerfallsmuster zuordnen. (Schema3)

Schema 3



Interessant ist ein Vergleich der Drehwerte.
Alle drei Verbindungen haben ein relativ geringes Drehvermögen. Torosachryson und Asperflavin mit $[\alpha]^{25}_{546} = +7°$ bzw. $[\alpha]^{25}_{546} = +4°$ zeigen dabei einen entgegengesetzten Drehsinn wie Atrochryson, $[\alpha]^{25}_{546} = -7°$.
Nähere Angaben über die Absolutkonfiguration können jedoch noch nicht gegeben werden.

2.5. Strukturaufklärung des Atrovirins (Grün 3) und des 4-Hydroxyatrochryson (Grün 2)

Fraktion 2 der Chromatographie des Rohextrakts von C.ATROVIRIN an Sephadex LH2o enthielt nach DC zwei dicht beieinander laufende Substanzen, Grün 3 und Grün 2, die sich an acetyliertem Polyamid nur unvollständig auftrennen ließen. Aceton eluierte zunächst Grün 3, mit Aceton/Methanol (1:) ein Gemisch aus Grün3 und 2. Eine weitere chromatographische Reinigung war nicht möglich, so daß eine Identifizierung aus dem Gemisch heraus versucht wurde.

2.5.1. Spektroskopische Daten von Atrovirin

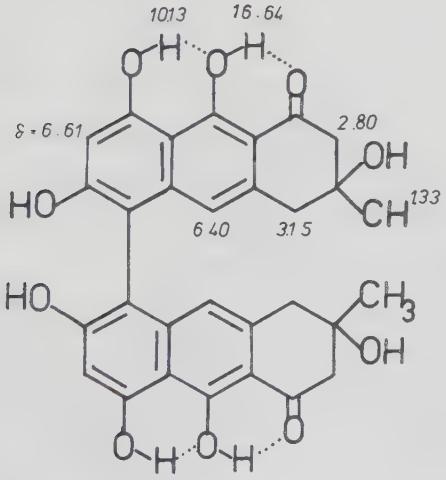
Das Massenspektrum des aus Essigester/Petrolether in Mikrokristallen ausfallende Grün 3 zeigt neben dem schwachen Molpeak M^+ m/e 546 ($C_{3o}H_{26}O_{1o}$) mit den Fragmenten 528 (M^+-H_2O), 51o ($M^+-H_2O-H_2O$), intensive Peaks im halben Massenbereich (m/e 274, 256, 241, 216). Das Pigment Grün 3 stellt also eine dimere Verbindung dar.

Das relativ einfache NMR-Spektrum läßt auf eine symmetrisch Verknüpfung der Molekülhälften schließen: Neben Signalen für die CH_3-Gruppe bei δ= 1.33, für die CH_2-Gruppen bei 2.8o bzw. 3.15 und für die chelatisierten OH-Gruppen bei 1o.13 und 16.64, treten im Aromatenbereich zwei Singuletts bei 6.4o(s,br) und 6.61 ppm auf. Als mögliche Verknüpfungsstellen kommen demnach nur C-5 und C-7 in

Frage.

Da jedoch die Aromatensignale von Flavomannin (6)[8] mit 6.65(s, H-5) und 6.88(s,H-1o) deutlich unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen, ist eine 5,5'-Verknüpfung der Monomeren wahrscheinlicher.

Damit ergibt sich für Atrovirin der Strukturvorschlag (48).



48

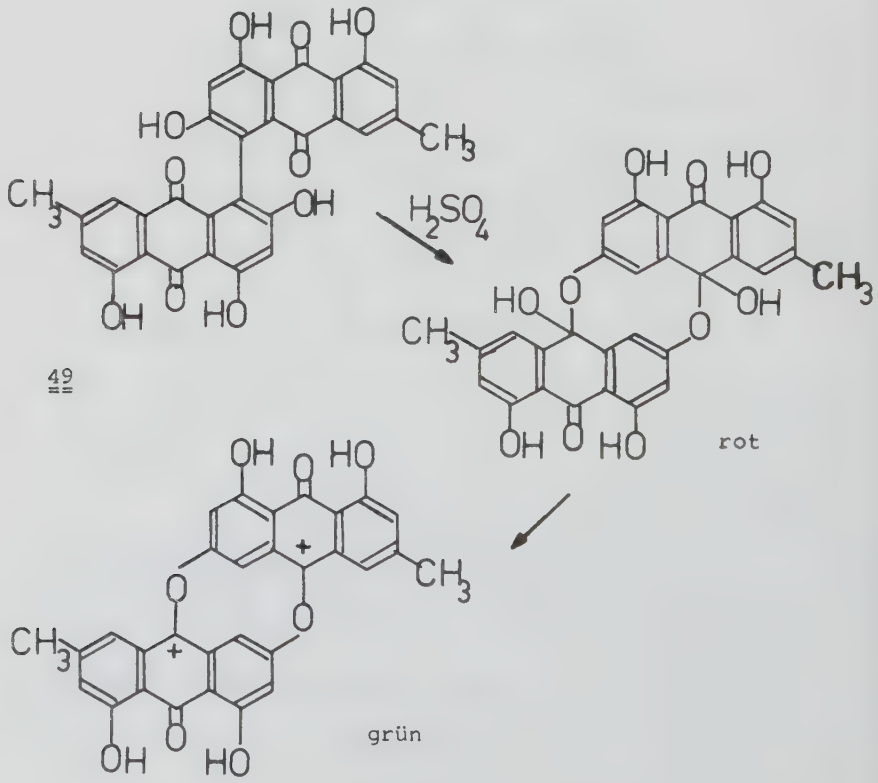
2.5.2 Oxidation zu Skyrin

Der eindeutige Beweis für die 5,5'-Verknüpfung wird durch alkalische Oxidation zum entspechenden Bianthrachinon erbracht.

Kurzzeitiges Erhitzen von Atrovirin mit 5-proz. Natronlauge führt zu einem orangeroten Oxidationsprodukt, das

nach DC-Vergleich mit der authentischen Verbindung das zu erwartende 5,5'-Bianthrachinon Skyrin (49) ist. Skyrin, das als Pigment aus verschiedenen PENICILLIUM-Arten[32] isoliert wurde, zeigt beim Besprühen seines DCs mit konz. H_2SO_4 eine charakteristische Farbreaktion: Der orangerote Substanzfleck verfärbt sich zunächst rot, dann leuchtend grün[33].

Schema 4 Farbreaktion von Skyrin mit konz. H_2SO_4



Mit Atrovirin konnte erstmals ein Phlegmacien-Pigment mit 5,5'-Verknüpfung isoliert werden. Interessanterweise trägt es im Unterschied zu den bisher beschriebenen Pilzpigmenten vom Flavomannin- und Phlegmacintyp an C-6 keine Methoxygruppe. Diese Methoxygruppe hat vermutlich einen Einfluß auf die Farbigkeit der Pigmente, denn das unmethylierte Atrovirin ist deutlich grün, die methylierten Verbindungen sind eher grüngelb bis gelb.

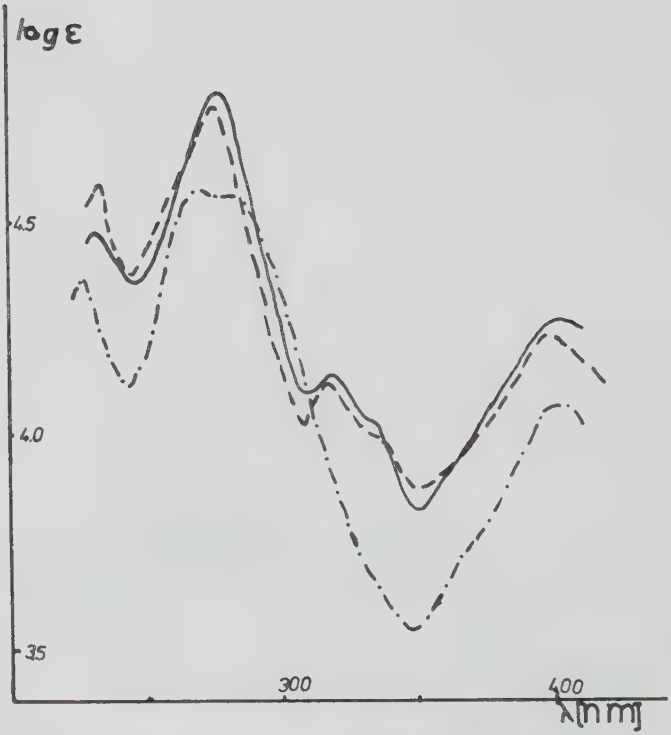
Trotz der unterschiedlichen Verknüpfungsart sind UV- und IR-Daten der dimeren Verbindungen sehr ähnlich. Aus den UV-Kurven (Abb. 6) ist das bereits erwähnte 1.8-Dihydroxynaphthalinchromophor (s.Tabelle 1) ersichtlich.

Typisch für die IR-Spektren der Pigmente ist eine verbreiterte Bande bei 3400 cm^{-1} für Hydroxygruppen und eine starke Bande bei 1635 cm^{-1} für eine chelatisierte Carbonylgruppe.

2.5.3 Die spektroskopischen Daten von 4-Hydroxyatrochryson

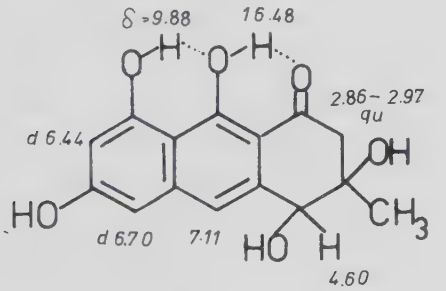
Die spektroskopische Untersuchung ergab für Grün 2 einen Molpeak von m/e 290 mit der Zusammensetzung $C_{15}H_{14}O_6$. Es unterscheidet sich somit von Atrochryson durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe.
Die Lage dieser Hydroxylgruppe ergibt sich aus dem Vergleich der NMR-Spektren der beiden Monomeren.

Abb. 6 Vergleich der UV-Spektren



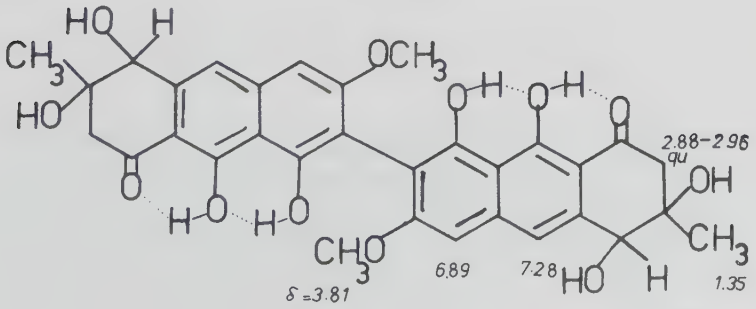
(in Methanol; Flavomannin-6,6'-dimethylether
———, Phlegmacin -------,Atrovirin -.-.-.)

Das Signal für H-1o zeigt eine deutliche Tieffeldverschiebung und ist wesentlich schärfer. Die 4-CH_2-Gruppe fehlt, dagegen tritt ein zusätzliches Signal bei 4.6o ppm auf. Die 2-CH_2-Gruppe wird zu einem AB-System mit $\underline{J}$ =17Hz aufgespalten. Demnach kann sich die Hydroxygruppe nur in 4-Position befinden, und für Grün 2 ergibt sich die Struktur eines 4-Hydroxyatrochrysons ($\underline{\underline{5o}}$)



$\underline{\underline{5o}}$

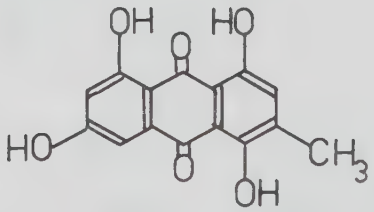
Diese NMR-Daten stimmen gut mit denen für 4,4'-Dihydroxyflavomannin-6,6'-dimethylether ($\underline{\underline{5}}$) aus TRICHOLOMA SULFUREUM [7] überein.



$\underline{\underline{5}}$

2.5.4. Oxidation zu Catenarin

Auch hier sollte die Oxidation zum entsprechenden Anthrachinon einen sicheren Strukturbeweis bringen. Wegen der geringen Substanzmenge konnte jedoch nur ein Handversuch durchgeführt werden.
Beim Erhitzen von 4-Hydroxyatrochryson mit 5-proz. Natronlauge verfärbte sich die Lösung blauviolett. Ansäuern und Ausschütteln mit Essigester führte zu einem Oxidationsprodukt, das nach DC-Vergleich mit authentischer Probe und typischen Farbreaktionen als Catenarin (51)[34] identifiziert werden konnte.



51

2.6. Strukturaufklärung von 4,4'-Dioxoatrovirin

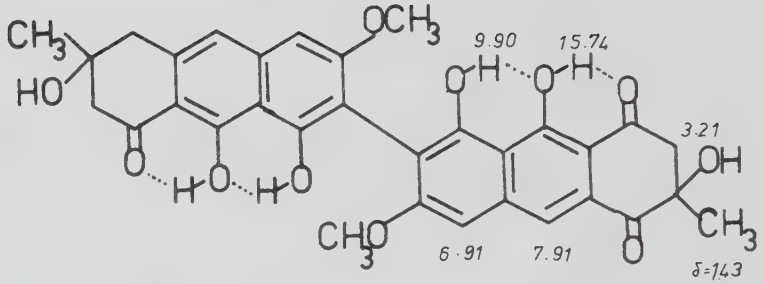
Fraktion 3 der Chromatographie des Rohextrakts von C.ATROVIRENS enthielt das sehr instabile und extrem polare Hauptpigment. Mit den verwendeten Chromatographie-

materialien bildete es leicht Komplexe, was die Reinigung sehr erschwerte. Auf Kieselgelplättchen verfärbte sich das Pigment, ähnlich wie 4-Hydroxyatrochryson, innerhalb weniger Stunden graublau.
Grün 1 wurde an Sephadex LH2o mit Methanol rechromatographiert und aus Essigester/Petrolether als hellolivgrünes Pulver auskristallisiert.

2.6.1. Spektroskopische Daten

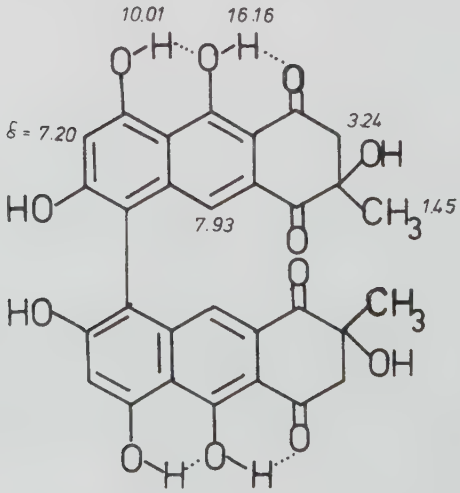
Da das Pigment sich im Massenspektrometer nur sehr schwer verflüchtigte und erst bei extrem hohen Verdampfungstemperaturen die zunächst nicht zuzuordnenden Peaks m/e 538 und 52o lieferte, wurde versucht, die Struktur mit Hilfe von NMR-,IR- und UV-Spektren zu ermitteln.

Das NMR-Spektrum zeigt wie im Fall des Atrovirins nur sehr wenige Signale,die wieder auf eine symmetrische Verbindung schließen lassen.
Auffallend ist die starke Tieffeldverschiebung der Aromatensignale nach 7,2o(s) und 7.93(s) ppm. Beide Signale sind sehr scharf, eine benzylische Kopplung mit der Methylengruppe in 4-Stellung findet nicht statt.
Die extrem tiefe Lage des Aromatensignals bei 7,93pppm und das zu tiefem Feld verschobene Signal einer CH_2-Gruppe bei 3.24 ppm erinnert an 4-Oxoflavomannin-6,6'-dimethylether (7), ein Pigment, das aus TRICHOLOMA SULFUREUM[7] isoliert wurde.



7

Da eine Hälfte der NMR-Signale dieser Verbindung mit den für Grün 1 ermittelten Daten vergleichbar ist, wird für das Hauptpigment von C.ATROVIRENS die Struktur eines 4,4'-Dioxoatrovirins (52) vorgeschlagen.

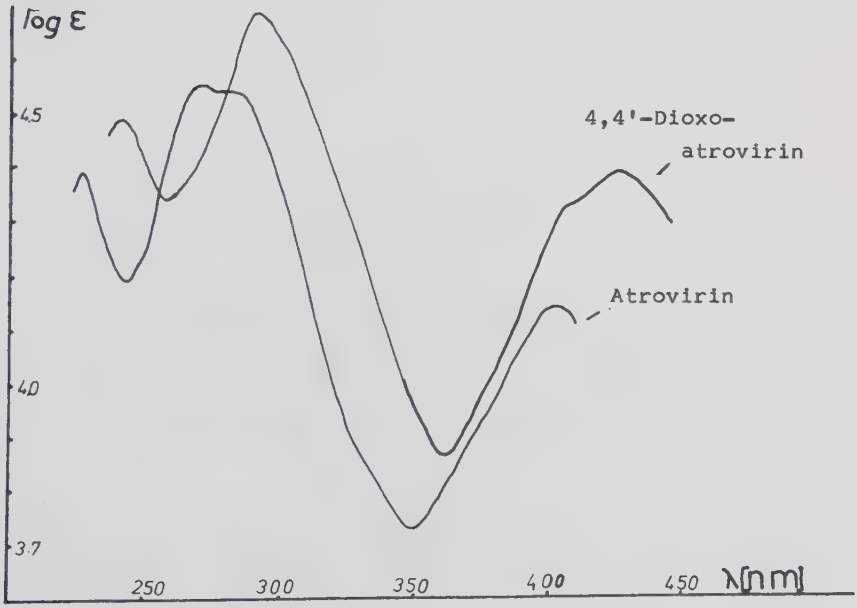


52

Die zusätzliche, nicht chelatisierte Carbonylgruppe in 4-Stellung zeigt sich im IR-Spektrum in einer Bande bei 17oo cm^{-1}, die Bande bei 162o cm^{-1} wird der chelatisierten Carbonylgruppe in 1-Position zugeschrieben.

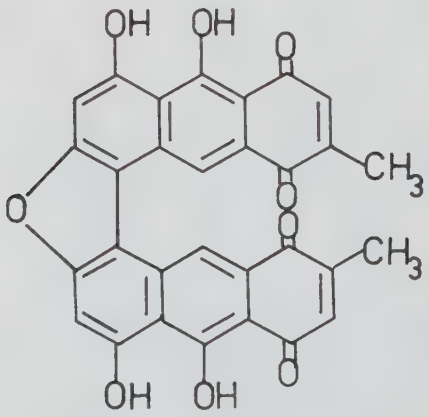
Die bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima, im Vergleich zum UV-Spektrum des Atrovirins, läßt sich mit einer Vergrößerung des 1,8-Dihydroxy-acylnaphthalin-chromophors durch die zusätzliche konjugierte Doppelbindung erklären (Abb.7)

Abb.7 Vergleich der UV-Spektren von Atrovirin und 4,4'-Dioxoatrovirin (in Methanol)



Ein weiteres Argument für die Struktur bringt das ^{13}C-Spektrum mit zwei $\rangle C{=}O$ Signalen bei δ = 201 und 204 ppm und nur einem CH_2-Signal bei 51.3 ppm.
Die ^{13}C-NMR-Spektren der Phlegmacien-Pigmente sollen in Kap. 6 gemeinsam diskutiert werden.

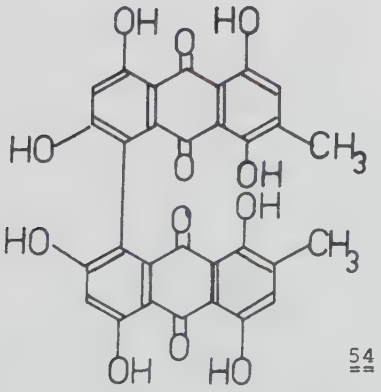
4,4'-Dioxoatrovirin hat ein Molgewicht von 574.48 und eine Summenformel $C_{30}H_{22}O_{12}$. Das im MS auftretende Fragment m/e 538 ($C_{30}H_{18}O_{10}$) wird durch zwei Wasserabspaltungen entstanden sein. Der Molpeak M^+ m/e 574 konnte vermutlich wegen der extrem hohen Verdampfungstemperatur von 260°C nicht nachgewiesen werden. Eine weitere Wasserabspaltung führt zu einem stabilen Fragment m/e 520 (53), von dem aus keine weiteren Fragmentierungen mehr erfolgen.
Damit ergibt sich ein signifikanter Unterschied zum Atrovirin, das bevorzugt in monomere Fragmente zerfällt.



53

2.6.2. Oxidation zu Dicatenarin

Die Oxidation von Dioxoatrovirin zu Dicatenarin (54)[35] und die anschließende Spaltung zu Catenarin (51) sollte einen entgültigen Strukturbeweis erbringen.
In einem Handversuch wurde das Pigment mit 5-proz. Natronlauge erhitzt. Ansäuern der tiefblauen Lösung und Ausschütteln mit Essigester führte zu einem rotvioletten Oxidationsprodukt, das aufgrund der geringen Konzentration und fehlender Vergleichssubstanz nicht identifiziert werden konnte. Nach reduktiver Spaltung des Oxidationsprodukts mit Dithionit in Na_2CO_3-Lösung[36] erhielt man neben Verunreinigungen eine rote Substanz, die sich nach DC-Vergleich mit authentischer Probe und der typischen Fluoreszenzerscheinung im UV-Licht mit Catenarin (51) als identisch erwies.

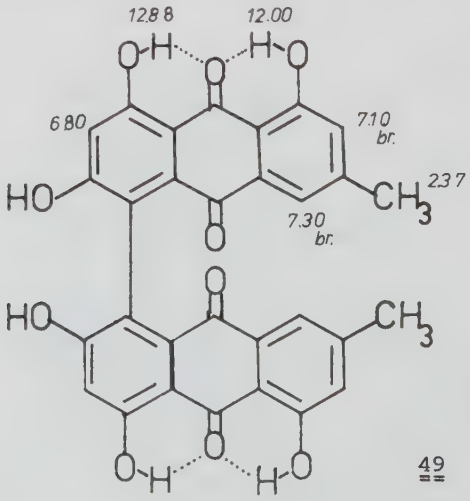


54

2.7. Identifizierung der gelben und roten Pigmente

Das orangerote Pigment der Fraktion 4 der Chromatographie des Rohextrakts von C.ATROVIRENS wurde über präparative Dickschichtplatten (Kieselgel, 'saures' Laufmittel) gereinigt. Aufgrund seiner typischen grünen Farbreaktion mit H_2SO_4 konnte es schnell als (+)-Skyrin (49) identifiziert werden.

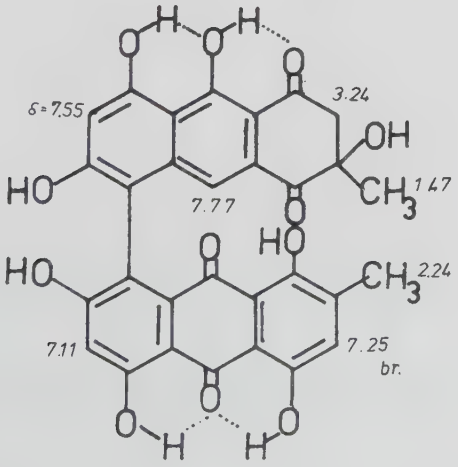
Die spektroskopischen Daten (MS, IR und UV) und der Schmelzpunkt stimmen mit den in der Literatur [32] angegebenen Werten überein. Das NMR-Spektrum des Bianthrachinons zeigt die charakteristischen durch Kopplung mit der Methylgruppe zu einem Multiplett aufgespaltenen Signale für H-2 und H-4. Die Lage der chelatisierten OH-Gruppen bei 12.oo bzw 12.88 ppm ist typisch für 1,8-Dihydroxyanthrachinone.



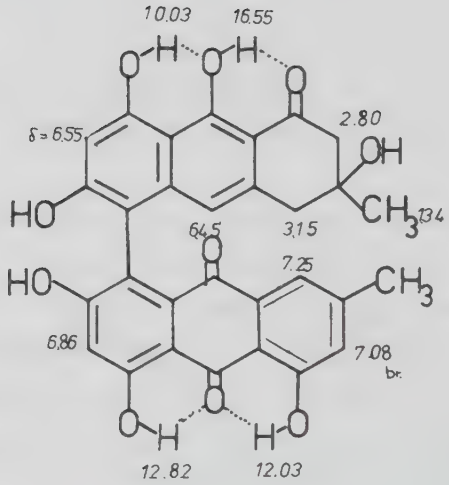
49

Da Skyrin zunächst nur in Spuren nachgewiesen wurde, aber im Verlauf der Aufarbeitung verstärkt anfiel, liegt die Vermutung nahe, daß es als Artefakt durch Oxidation von Atrovirin entsteht.

Ebenfalls Artefakte sind vermutlich zwei gelbe Pigmente, die bei der Rechromatographie von Fraktion 5 an Sephadex LH2o mit Methanol isoliert wurden.
Beide Pigmente enthalten nach ihren NMR-Spektren eine zum Anthrachinon aufoxidierte Molekülhälfte, während die anderen Signale jeweils Tetrahydroanthracensystemen zugeordnet werden können.
Aus dem Vergleich der NMR-Spektren mit denen der grünen Pigmente aus C.ATROVIRENS ergibt sich für Gelb 1 die Struktur eines Anhydro-4,4'-dioxoatrovirin-9,1o-chinons (55) . Gelb 2 könnte als Anhydroatrovirin-9,1o-chinon (56) identifiziert werden.



55



56

Die intensiv roten Substanzen, die bei der Aufarbeitung der gefriergetrockneten Pilze isoliert wurden, konnten über präparative Dickschichtplatten (Kieselgel,'saures' Laufmittel) gereinigt werden.

Aufgrund der sehr geringen Substanzmengen konnten sie nicht weiter untersucht werden. Nach ihren Anfärbereaktionen kann man jedoch annehmen, daß es sich um Anthrachinone handeln muß.

Eins dieser Pigmente zeigt unter der UV-Lampe (λ = 366nm) eine intensive hellgelbe Fluoreszenz, ein Verhalten, das an Catenarin (51) erinnert. Vermutlich ist dieses Pigment Dicatenarin (54), ein Vergleich mit der authentischen Probe war nicht möglich.

2.8. Zur Stereochemie der Pigmente

Bei den in 5,5'-verknüpften Pigmenten vom Atrovirintyp sollten sich wie bei den Flavomannin- bzw. Phlegmacinderivaten die behinderte Rotation um die Biarylbindung in einem hohen optischen Drehvermögen und einer CD-Kurve mit starkem Cotton-Effekt zwischen 27o und 3oo nm äußern. Interessanterweise zeigen die beiden Pigmente Atrovirin und 4,4'-Dioxoatrovirin einen entgegengesetzten Verlauf der CD-Kurven (Abb.8).
Nach der in Kap. 1.2.5. hergeleiteten Definition kann Atrovirin mit B und Dioxoatrovirin mit A gekennzeichnet werden.
Das monomere Atrochryson hat mit $[\alpha] = -7^{\circ}$ das erwartet geringe Drehvermögen, die CD-Kurve ist dementsprechend sehr flach.

Shibata[11] isolierte aus CASSIA TOROSA neben (+)-Torosachryson (46) zwei diastereomere Formen von Phlegmacin, die ein Enantiomerenpaar zu den aus C.ODORIFER isolierten Phlegmacinen A_1 und B_1 darstellen. Er formulierte daraufhin die Vermutung, daß die Biosynthese des Monomeren stets stereospezifisch abläuft und zwar zu (+)-Torosachryson in höheren Pflanzen und der entsprechenden linksdrehenden Verbindung in Pilzen. Die Dimerisierung dagegen muß nicht stereospezifisch sein.
Diese Vermutung wird durch die Isolierung von (-)-Atro-

chryson und der Dimeren (+)-Atrovirin B_1 und (-)- Dioxoatrovirin A_1 zwar bestätigt, das Vorkommen von Phlegmacin-8-methylether A_1 und B_1 aus C.PERCOMIS[3,10] und von Phlegmacinmethylether B_2 aus C.ELEGANTIOR[3] steht jedoch nicht im Einklang mit dieser Vermutung.
In Abb. 9 ist die CD-Kurve des durch Oxidation von Atrovirin gebildete (+)-Skyrin (49) aufgezeigt.

Abb. 8 CD-Kurven von Atrovirin B_1 und 4,4'-Dioxoatrovirin A_1

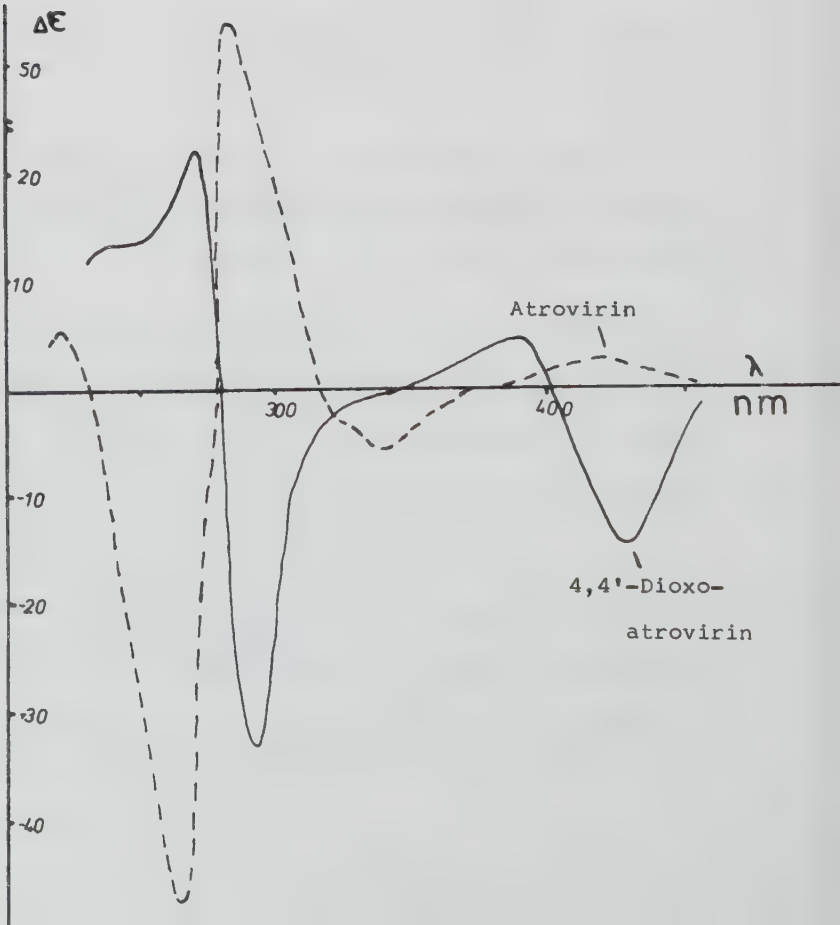
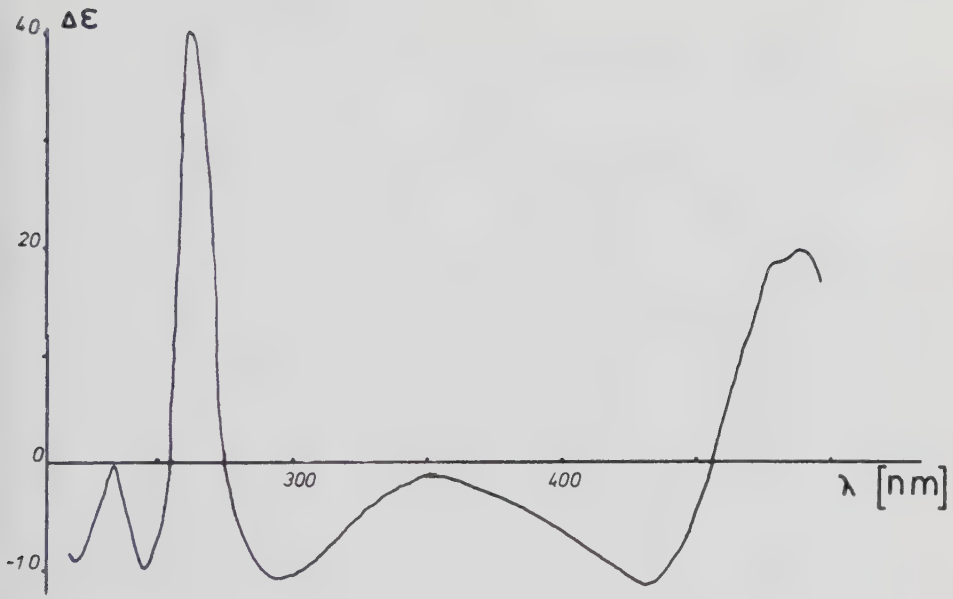


Abb. 9 CD von Skyrin (49) (in Methanol)



2.9. Bedeutung der Pigmente für die Biosynthese

Mit Atrochryson (19) konnte aus C.ATROVIRENS die Schlüsselverbindung der Anthrachinonbiosynthese, das durch Aldolkondensation einer Oktaketidkette gebildete 3,4-Dihydro-3,6,8,9-tetrahydroxy-3-methylanthracen-1-on, isoliert werden.
Für das durch Phenoloxidation entstehende Radikal (57) kann eine Anzahl mesomerer Grenzstrukturen formuliert werden, die zu den verschiedenen über C-C oder C-O verknüpften dimeren Verbindungen kuppeln können.
Die bisher in Phlegmacien nachgewiesenen Verknüpfungsarten (7,7'; 7,1o'; 5,5' und 8,1o' mit einer Etherbrücke) sind in Schema 5 zusammengefaßt.

An der aus C.ATROVIRENS isolierten Pigmentsequenz Atrochryson, Atrovirin und Skyrin bzw. 4-Hydroxyatrochryson, 4,4'-Dioxoatrovirin und Dicatenarin läßt sich dieses Biosyntheseschema nachvollziehen.

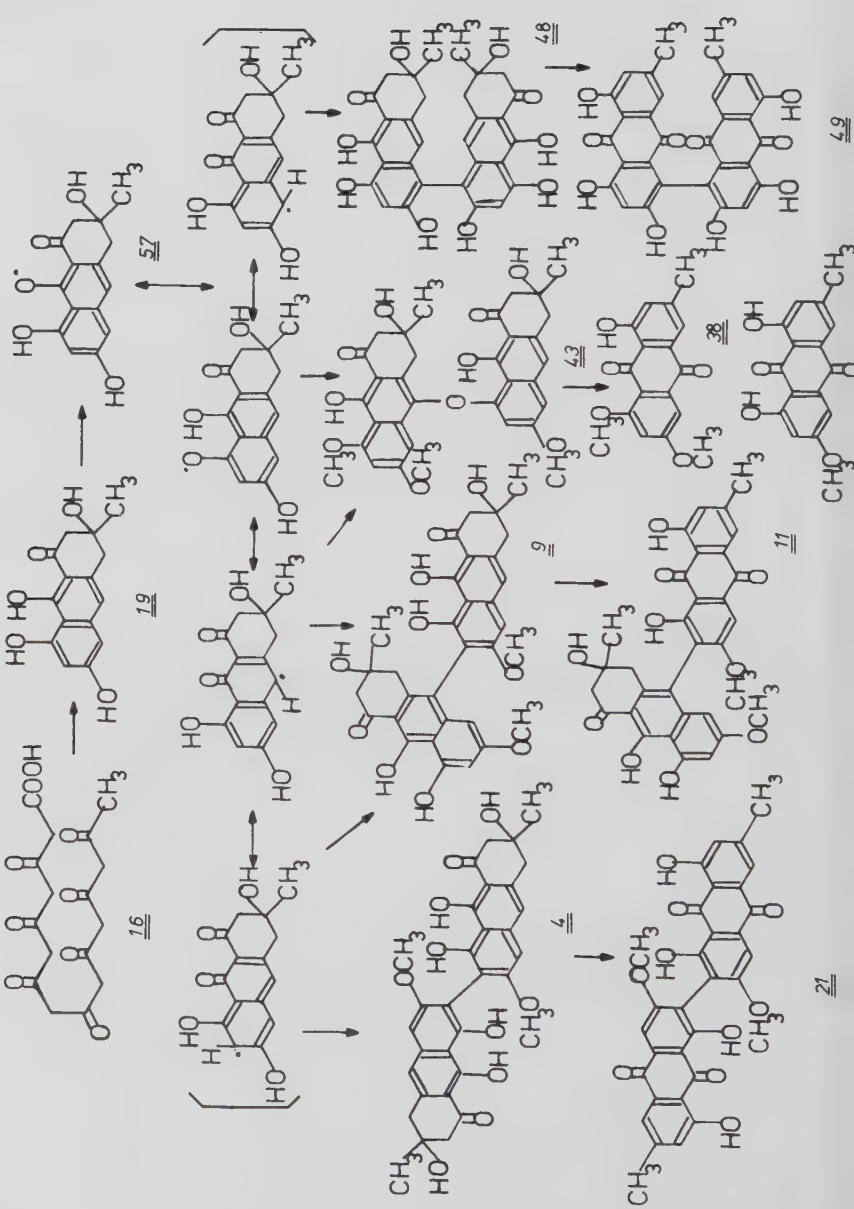
Das Bianthrachinon Skyrin wird demnach in Höheren Pilzen wahrscheinlich durch oxidative Kopplung von 3,4-Dihydro-3,6,8,9-tetrahydroxyanthracen-1-on (19), und nicht durch eine Diels-Alder-Cycloaddition von partiell hydriertem Emodin (23), wie es Shibata für die Biosynthese in PENICILLIUM-Arten vorschlug (s.Schema 2).

Für Hypericin (57), einem photodynamischen Pigment aus HYPERICUM HIRSUTUM, wurde ein Biosyntheseweg vorgeschlagen, der ebenfalls über oxidative Phenolkopplung von 'Preemodin' (19) ablaufen soll[37].
Das in 5,5'-verknüpfte Dimere 48 spaltet Wasser ab und wird zu Penicilliopsin (58) isomerisiert. Über Protohypericin (58a) als Zwischenstufe werden die beiden Molekülhäften zu Hypericin (57) kondensiert.(Schema 6)

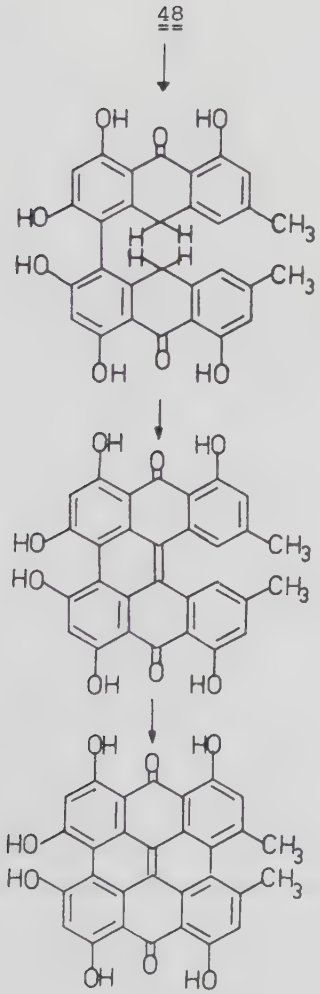
Die Selektivität der Biosynthesen in den einzelnen Organismen zeigt sich deutlich, wenn man die Stoffwechselprodukte aus C.ATROVIRENS und H.HIRSUTUM vergleicht. Ausgehend von den gleichen Ausgangsverbindungen bildet der Pilz nur Skyrin, Penicilliopsin und seine Folgeprodukte konnten nicht nachgewiesen werden.

Kürzlich gelang es Moser und Keller[38], auch aus den getrockneten Fruchtkörpern einer DERMOCYBEN-Art aus Neuguinea, gleichzeitig Hypericin und Skyrin zu isolieren.

Schema 5



Schema 6


48
OH
HO
HO
CH3
HO
CH3
OH
HO
58
OH
HO
HO
CH3
HO
CH3
OH
HO
58a
OH
HO
HO
CH3
HO
CH3
OH
HO
57

3. Die Pigmente aus C.AUREOTURBINATUS

3.1. Der Pilz

C.AUREOTURBINATUS, der Prächtige Klumpfuß, fällt durch seine intensive Farbigkeit auf. Der leuchtend chromgelbe Hut ist in der Mitte lebhaft orange-fuchsig gefärbt, die Lamellen sind zitronengelb, der Stiel etwas blasser gelb bis grüngelb.
Das gelbgrüne, im Kern weißliche Fruchtfleisch zeigt mit KOH eine rotbraune bis blutrote Farbreaktion. Nach Moser[1)] ist C.AUREOTURBINATUS streng an Laubhölzer, meist Buche, und Kalkböden gebunden.

3.2. Aufarbeitung der Pilze

Die in Methanol/Ascorbinsäure/HCl eingelegten Pilze wurden nach üblicher Methode aufgearbeitet. Der gelbbraune Rohextrakt zeigte zwei Substanzflecken: ein grüngelbes Hauptpigment und ein gelbes Nebenpigment mit höherem R_F-Wert. Die Pigmente wurden durch Chromatographie an acetyliertem Polyamid getrennt; dabei eluierte Toluol das gelbe Nebenpigment und Toluol/Essigester das grüngelbe Hauptpigment. Beide Substanzen konnten aus Essigester/Petrolether als mikrokristalline Pulver ausgefällt werden.

3.3. Die Pigmente

In seinem chromatographischen Verhalten erinnerte der

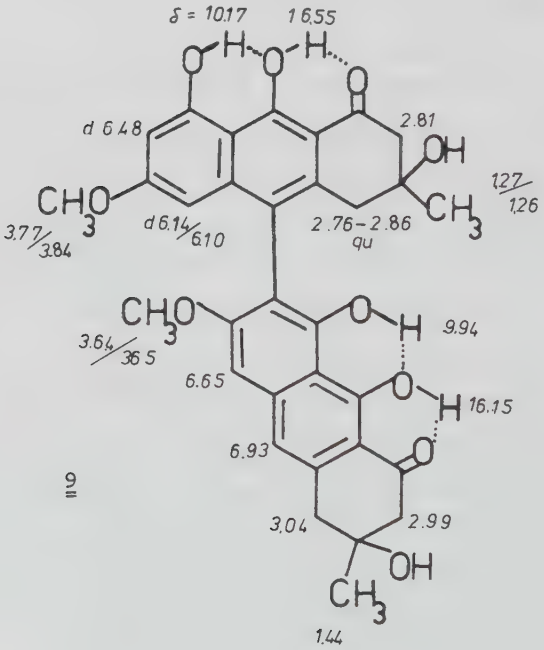
grüngelbe Farbstoff an Phlegmacin (9), das Hauptpigment aus C.ODORIFER. Nach seinen spektroskopischen Daten (UV, MS, IR und NMR) erwies er sich als identisch mit dem von Töpfer-Petersen[3,9] beschriebenen Pigment. Das gelbe Nebenpigment stimmte in seinen Eigenschaften mit Anhydrophlegmacin- 9,1o-chinon (11) überein.

Das NMR-Spektrum von Phlegmacin aus C.AUREOTURBINATUS zeigt den für die 7,1o'-Verknüpfung typischen Aromatenbereich mit zwei Singuletts bei δ = 6,93 (s,br) und 6,65 (s) und zwei Dubletts mit J =2,5Hz bei 6,46 und 6,14 ppm. Interessanterweise ist das Dublett bei δ= 6.14 von einem um o,4 ppm zu höherem Feld verschobenen Dublett bei 6,1oppm (J =2,5Hz) begleitet. Auch eines der OCH_3 und eines der CH_3-Signale sind deutlich angespalten.

Es liegt daher die Vermutung nahe, daß Phlegmacin als Gemisch zweier atropisomerer Formen vorliegt, in denen sich, wie bei Cortinarin (43), einige der Protonen aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Umgebung in ihrer chemischen Verschiebung unterscheiden.

Betrachtet man ein Dreiding-Modell von Phlegmacin, so erkennt man deutlich, daß bei der Rotation um die Biarylbindung das 5'-Proton besonders beeinflußt wird. Es kann damit dem Doppeldublett bei 6,14/6,1o ppm zugeordnet werden. Die von Töpfer-Petersen angegebene Zuordnung muß daher für die Protonen in 5' und 7'-Stellung geändert

werden. Shibata[11], der aus CASSIA TOROSA ebenfalls Phlegmacin als Atropisomerenpaar isolierte, konnte die Zuordnung der NMR-Daten mit Hilfe eines Kern-Overhauser-Experiments eindeutig belegen.



9

3.4. Zur Stereochemie von Phlegmacin

Wie bereits erwähnt, stellt das aus der CASSIA-Art isolierte Diastereomerenpaar die Enantiomeren des aus C.ODORIFER und C.AUREOTURBINATUS gewonnenen Phlegmacingemischs dar. Durch Chromatographie an Kieselgel mit Benzol-Chloro-

form als Eluenten gelang es Shibata [11], die beiden Diastereomerenpaare zu trennen und sie mit Hilfe von ORD-Kurven zu vergleichen. Danach wurden die aus den Phlegmacien-Arten gewonnenen Pigmente gemäß der von Steglich vorgeschlagenen Definition mit Phlegmacin A_1 und B_1 bezeichnet, die von Shibata beschriebenen Verbindungen dementsprechend A_2 und B_2.

In Tab. 2 sind die von Shibata[11] ermittelten ORD-Daten der Enantiomerenpaare Phlegmacin A_1 und B_2 bzw. Phlegmacin A_2 und B_1 aufgeführt.

Tab. 2 ORD-Daten der Phlegmacine ($\alpha \times 10^{-4}$)

(nm)	275	288	294	360
A_1	+27.1	0	-10.8	+1.13
B_2	-50.7	0	+ 7.5	0
A_2	+48.6	0	- 8.1	- 0.2
B_1	-34.0	0	+11.0	+ 2.0 *)

(*) Diese von Töpfer-Petersen[3,9] übernommenen Werte für B_1 sind absolut gesehen zu klein, da ein 2:1 Gemisch von B_1 und A_1 vermessen wurde (s.u).)

Der Drehwert $[\alpha]_{546}^{20} = -99^\circ$ und der relativ starke Cotton-Effekt bei 280 nm in der ORD- bzw. CD-Kurve (Abb.4) des Phlegmacingemischs aus den Phlegmacien-Arten weisen

jedoch darauf hin, daß kein 1:1 Gemisch der atropisomeren Formen vorliegt, sondern, daß die linksdrehende Komponente, Phlegmacin B_1, überwiegt.
Mit Hilfe der Integration des Doppeldubletts bei 6,14/6,1o ppm für die Protonen in 5'-Stellung läßt sich ein 2:1 Verhältnis der beiden Diastereomeren abschätzen.

Interessanterweise ist dieses Verhältnis der Atropisomeren sowohl bei C.AUREOTURBINATUS als auch bei C.ODORIFER anzutreffen. Vielleicht wird dadurch angezeigt, daß das linksdrehende Phlegmacin B_1 das thermodynamisch stabilere Diastereomere ist.

3.5. Bestimmung der Rotationsbarriere durch Koaleszenzmessung.

Mit Hilfe der temperaturabhängigen NMR-Messung sollte die Energiebarriere für die Rotation um die Biarylbindung festzustellen sein.
Da die beiden Konformere chromatographisch trennbar sind, muß die Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\neq}$ größer als 96 kJ/mol (23 kcal/mol) sein; die entsprechende Koaleszenstemperatur sollte demnach ungefähr 15o°C betragen.
Die Messung wurde in DMSO-d_6 durchgeführt. Das in Deutero-Chloroform als Doppeldublett aufgespaltene Signal von H-5' fiel aufgrund des Lösungsmitteleinflusses auf ein Triplett mit $\Delta\nu$= 3Hz zusammen.
Da jedoch das relativ instabile Phlegmacin sich bei einer

Temperatur von 130°C , also unterhalb des zu erwartenden Koaleszenzpunkts, thermisch zersetzte, ist seine freie Aktivierungsenthalpie nicht genau bestimmbar.
Mit T_c > 130°C und $\Delta\nu$=3Hz ergibt sich für $\Delta G^{\ddagger}$ ein Wert oberhalb von > 93.2 kJ/mol (22.3kcal/mol).

4. Die Pigmente aus C.RUFOOLIVACEUS (Fr.) Wünsche

4.1. Der Pilz

Dieser Pilz, der rotviolette Klumpfuß, steht farblich im Gegensatz zu den bisher beschriebenen gelben und grünen Phlegmacien-Arten. Nach der Beschreibung von Moser[1)] besitzt er einen purpurbräunlichen bis rotvioletten Hut. Auch der Stiel, die Knolle und das Fruchtfleisch sind violett bis rotbraun gefärbt. Lediglich die Lamellen haben jung eine gelbliche bis grüngelbe Farbe, später verfärben sie sich rost- bis zimtbraun.

4.2. Aufarbeitung der Pilze

Die bis zur Aufarbeitung in Methanol/Ascorbinsäure/HCl aufbewahrten Pilze wurden von der tiefroten Farblösung abfiltriert und mehrmals mit Methanol nachgewaschen. Das Chromatogramm des roten Rohextrakts zeigte ,nach fallendem R_F-Wert, zwei gelbe Substanzen Gelb 1 und Gelb 2, eine farblose Substanz und zwei rotviolette Hauptpigmente V1 und V2.

Der Rohextrakt wurde an acetyliertem Polyamid chromatographiert. Dabei eluierten Petrolether/Toluol die beiden gelben und die farblose Substanz, Toluol/Essigester 1:1 V1 und Methanol V2. Die Pigmente wurden rechromatographiert und spektroskopisch untersucht.

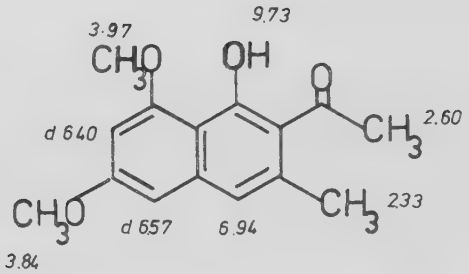
4.3. Strukturaufklärung der beiden gelben und der farblosen Substanz.

Die drei Substanzen der Fraktion 1 konnten mittels präparativer DC (Kieselgel,'saures Laufmittel') getrennt werden. Mit Hilfe von DC-Vergleichen mit authentischen Proben, MS und UV-Spektren konnten Gelb 1 und Gelb 2 als Physcion (38) und Physcion-8-methylether (39) identifiziert werden.

Die farblose Substanz wurde aus Ether/Petrolether in nadelförmigen Kristallen mit einem Schmelzpunkt von 98-100°C ausgefällt. Auf einem Kieselgelplättchen verfärbte sich die zunächst farblose Substanz intensiv gelb, und mit konz. H_2SO_4 zeigte sie eine charakteristische Orangefärbung.

Der Aromatenbereich ihres NMR-Spektrums mit zwei Dubletts (J =2.5 Hz) bei δ= 6,57 und 6,40 und einem verbreiterten Singulett bei 6,94 ppm erinnert an das NMR-Spektrum von Atrochryson (19). Es fehlen jedoch die CH_2-Gruppen für den hydrierten Ring des Dihydroanthracenderivats. Stattdessen treten zwei Methylsignale bei δ= 2,60 und 2,33 auf. Das höhere der beiden Singuletts ist angespalten, es koppelt mit dem verbreiterten Aromatensignal, was durch Einstrahlversuche bewiesen wurde. Zwei OCH_3-Signale bei 3,84 und 3,97 und eine chelatisierte OH-Gruppe bei 9,73 ppm geben weitere Hinweise auf die Struktur 59 für die farb-

lose Substanz.

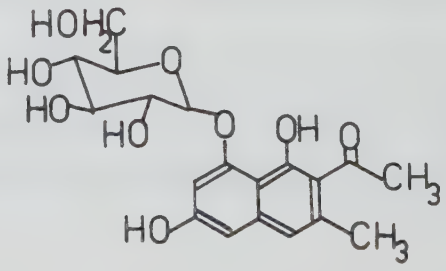


59

Das Massenspektrum mit dem Molpeak m/e 260 und der durch Hochauflösung ermittelte Zusammensetzung $C_{15}H_{16}O_4$ bestätigt das Ergebnis der NMR-Untersuchung.

2-Acetyl-6,8-dimethoxy-3-methyl-1-naphthol (59) wurde bereits vor einigen Jahren als Naturstoff isoliert, so z.B. von Shibata[39] als Torachryson 8-methylether aus C.TORA. Auch in einem der bereits erwähnten neurotoxischen Wirkstoffen aus KARWINSKIA HUMBOLDTIANA 12 wurde das Naphthalinderivat nachgewiesen [12].

Das unmethylierte 6-Hydroxymusizin isolierten Weiss et al.[40] als 8-O-β- D-glucosid 60 aus APHIS NERII.

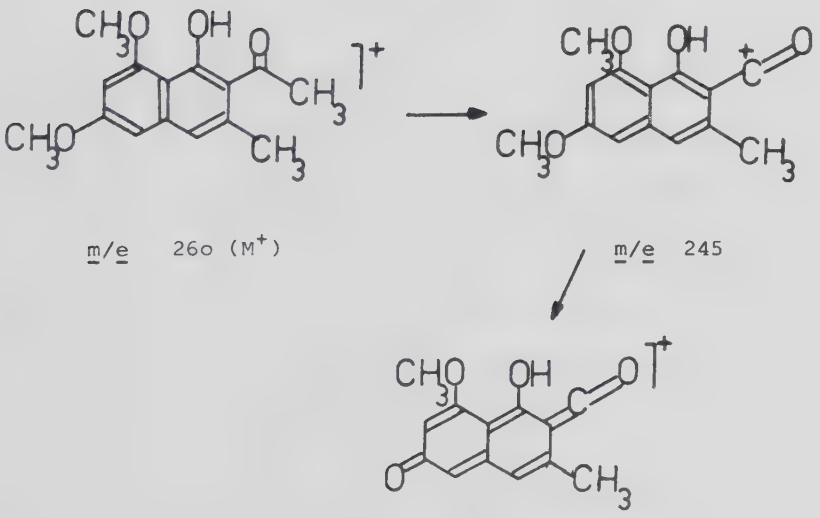


60

Die spektroskopischen Daten der farblosen Substanz aus C.RUFOOLIVACEUS stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein.

Die Fragmentionen des Massenspektrums m/e 26o (M^+, 58%), 245 (1oo%) und 23o (32%) lassen sich nach folgendem Schema zuordnen.

Schema 7



Im UV-Spektrum weist Torachrysonmethylether mit dem 1,8-Dihydroxyacylnaphthalinchromophor Ähnlichkeiten mit den Phlegmacien-Pigmenten auf.

Mit Torachryson-8-methylether wurde nun ein Metabolit isoliert, der nicht aus einem Oktaketid sondern aus einer um eine Acetateinheit verkürzte Heptaketidkette besteht. Die gleichzeitige Isolierung von Physcion und Physcion-8-methylether zeigt jedoch, daß C.RUFOOLIVACEUS Polyketidketten verschiedener Kettenlängen aufbauen kann.

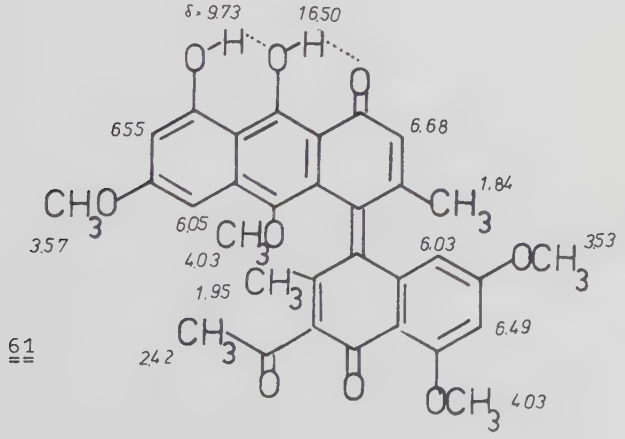
4.4. Strukturaufklärung des roten Farbstoffs V2

Die Reinigung der roten Farbstoffe aus C.RUFOOLIVACEUS gelang durch Chromatographie an Kieselgel. Da aber vorallem V2 mit dem Chromatographiematerial Komplexe bildete und erst mit Methanol/HOAc eluiert werden konnte, war diese Reinigung sehr verlustreich.
Über präparative Dickschicht (Kieselgel,'saures Laufmittel' wurde das Pigment V2 rechromatographiert und aus Chloroform/Petrolether als dunkelrotes Pulver auskristallisiert.

Der im Massenspektrum ermittelte Molpeak m/e 556 $C_{32}H_{28}O_9$ wird von einem Ion m/e 558 $C_{32}H_{30}O_9$ begleitet.
Durch diese Chinon-Hydrochinonbeziehung wird eine chinoide Struktur für V2 angezeigt.

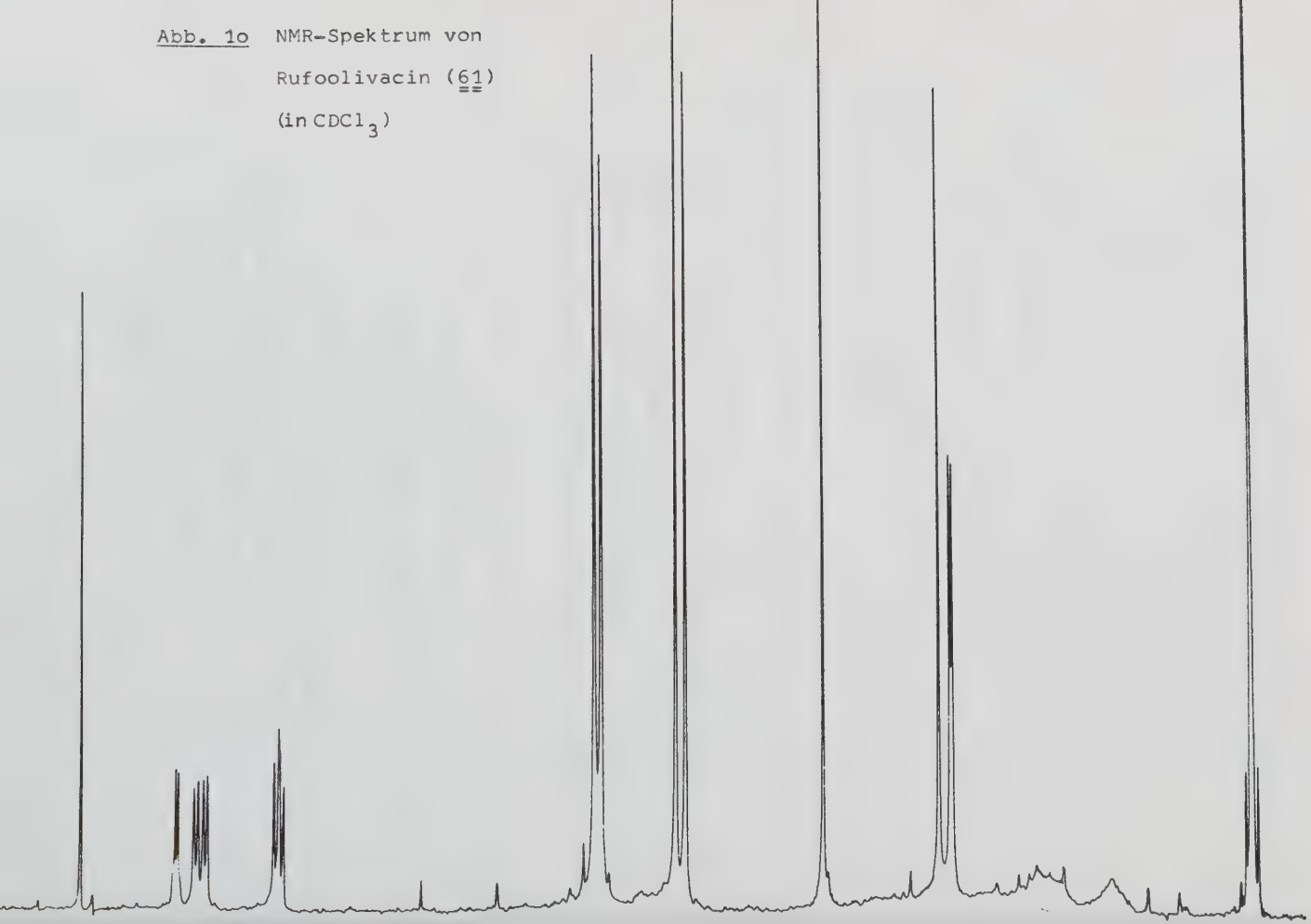
Das NMR-Spektrum (Abb.1o) zeigt im Aromatenbereich ein durch Kopplung mit einer CH_3-Gruppe (δ = 1.84 ppm) aufgespaltenes Singulett bei 6.68 und vier Dubletts mit $\underline{J}$ =2,5 Hz bei 6.55, 6.49, 6.o5 und 6.o3 ppm.
Die beiden letztgenannten Dubletts fallen fast zu einem Triplett zusammen. Es treten zwei weitere Methylsignale auf, von denen eines mit 2.6o ppm an das Acylmethylsignal aus Torachrysonmethylether (59) erinnert.

Aus NMR- und MS-Spektrum kann man nun schließen, daß eine dimere Verbindung vorliegt, deren eine Molekülhälfte ein der farblosen Substanz 59 ähnliches Acylnaphthalinderivat ist. Die Signale bei 9.73 und 16.5o ppm sind typisch für die chelatisierten OH-Gruppen eines 3,4-Dihydro-1,8-dihydroxyanthracen-1-ons.
Aufgrund der intensiven Farbigkeit der Verbindung und seines chinoiden Charakters wurde daher für V2, Rufoolivacin genannt, folgende Struktur (61) vorgeschlagen.



61

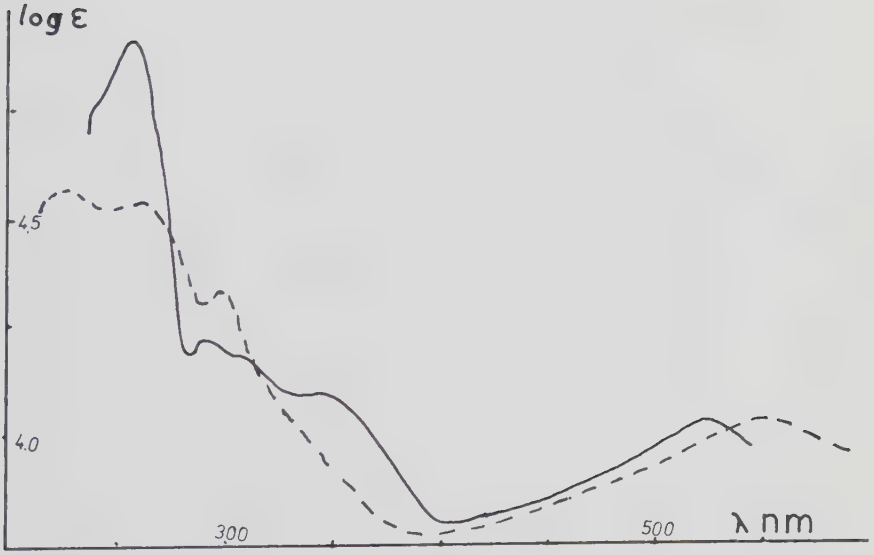
Abb. 1o NMR-Spektrum von Rufoolivacin (61) (in $CDCl_3$)



Die tiefrote Farbe von Rufoolivacin äußert sich im UV-Spektrum mit den Absorptionsmaxima bei 5o5 und 53o nm (Abb. 11).

Das IR-Spektrum zeigt mit 161o und 174o cm^{-1} die Banden einer chelatisierten und einer nicht chelatisierten Carbonylgruppe.

Abb. 11 UV-Spektren von Rufoolivacin und 2-Hydroxy-rufoolivacin (in Acetonitril)



Rufoolivacin -----

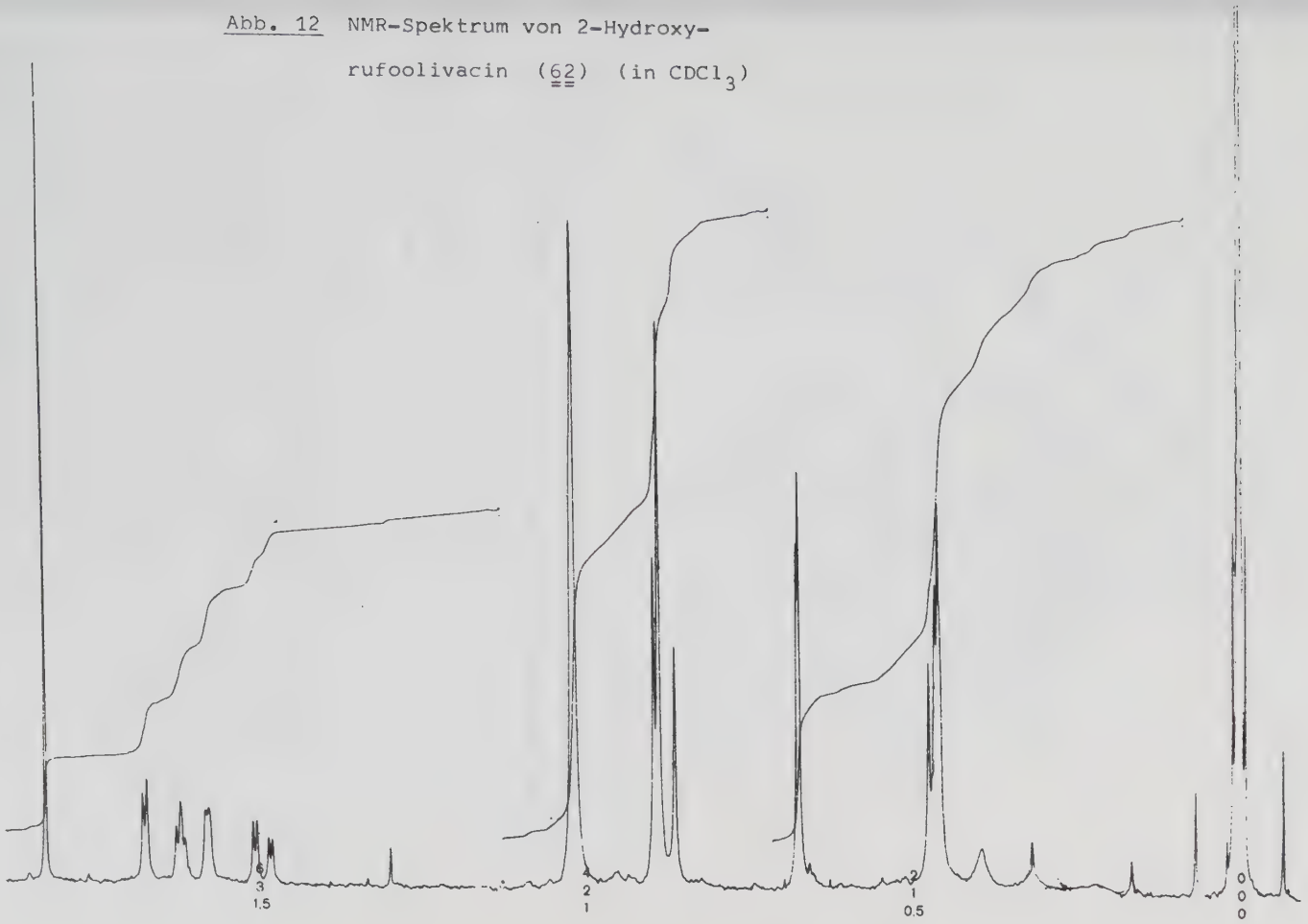
2-Hydroxyrufoolivacin ———

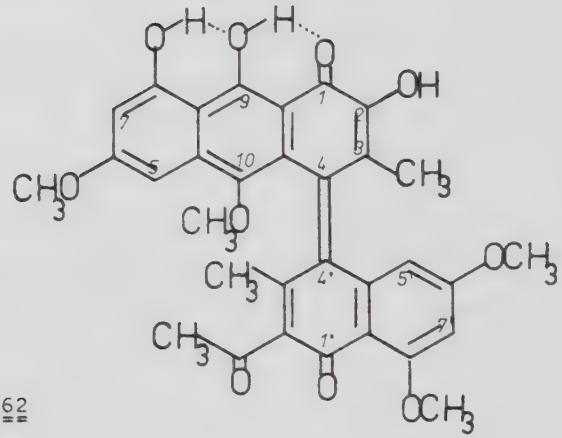
4.5. Strukturaufklärung des roten Hauptpigments V1

Nach Rechromatographie an Kieselgel mit Toluol/Essigester wurde das Pigment auf präparativen Dickschichtplatten (Kieselgel, 'saures Laufmittel') nachgereinigt. Es ließ sich aus Chloroform/Petrolether als dunkelrotes Pulver ausfällen.
Auf dem DC zeigt es beim Besprühen mit konz. H_2SO_4 sofort eine intensiv kornblumenblaue Farbreaktion. Diese Verfärbung tritt auch bei Rufoolivacin auf, jedoch erst nach einigen Minuten.

Das Massenspektrum von V1 zeigt einen Molpeak m/e 574 mit der Zusammensetzung $C_{32}H_{30}O_{10}$. Es unterscheidet sich also von V2 (M^++2H) durch ein zusätzliches Sauerstoffatom.
Aus dem Vergleich seines NMR-Spektrums (Abb. 12) mit dem von Rufoolivacin wird deutlich, daß eine zusätzliche OH-Gruppe an C-2 sitzen muß, da das mit einem CH_3-Signal koppelnde Aromatensignal fehlt. V1 sollte demnach die Struktur eines 2-Hydroxyrufoolivacin (62) besitzen.

Abb. 12 NMR-Spektrum von 2-Hydroxy-rufoolivacin (62) (in $CDCl_3$)





62

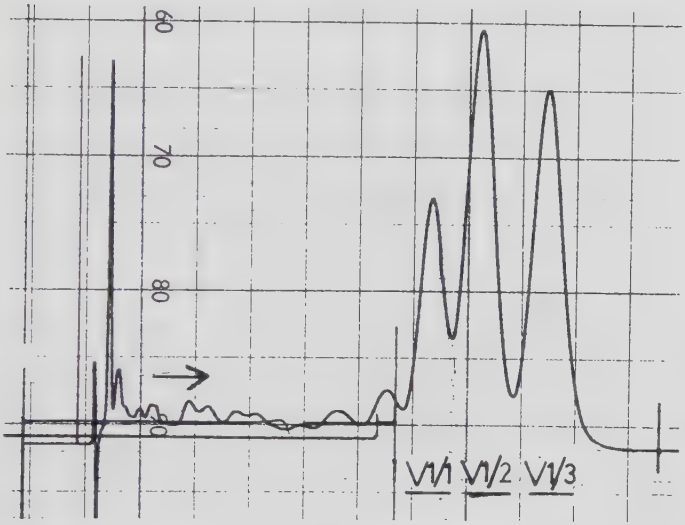
Entkopplungsversuche der Aromatensignale haben ergeben, daß 2-Hydroxyrufoolivacin als Gemisch zweier isomerer Formen a und b vorliegt.

Da das DC-Plättchen (Kieselgel,'saures Laufmittel') eine leichte Einschnürung des Substanzflecks zeigte, wurde versucht, die Isomeren chromatographisch zu trennen.

Mit Hife der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an 'reverser Phase'(mit C_{18}-Ketten belegtes Kieselgel als Chromatographiematerial) mit dem Eluentengemisch Methanol/ Wasser 77,5:22,5, stabilisiert mit o,2n Essigsäure, gelang

es, V1 in drei Fraktionen V1/1, V1/2 und V1/3 aufzutrennen

Abb. 13 HPLC-Chromatogramm von V1



Nach den NMR-Spektren der einzelnen Fraktionen können die in Abb.11 mit a gekennzeichneten Signale der Fraktion V1/1 und die mit b bezeichneten V1/3 zugeordnet werden. Anhand eines Molekülmodells wird folgende Zuordnung der Signale vorgeschlagen (Tab. 3)

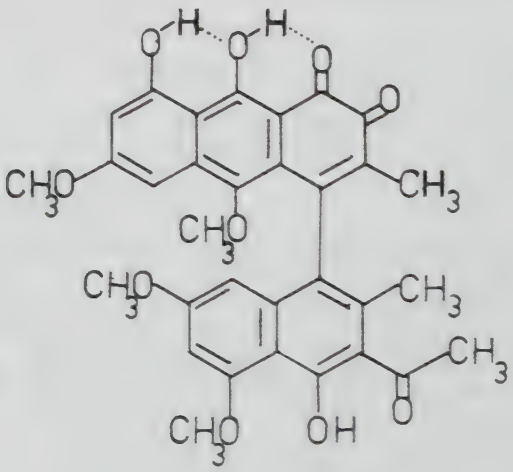
Tab. 3 NMR-Daten von V1/1 und V1/3 (in $CDCl_3$)

	H-5	H-7	CH_3(3)	OCH_3(1o)	OCH_3(6)	OH(8)	OH(9)
V1/1	6.24	6.64	1.8o	4.o5	3.52	9.68	15.66
V1/3	6.25	6.65	1.8o	4.o3	3.55	9.71	15.66

	H-5'	H-7'	CH_3(3')	$COCH_3$(2')	OCH_3(6')	OCH_3(8')
V1/1	5.88	6.41	1.88	2.69	3.43	4.o5
V1/3	5.97	6.44	1.84	2.67	3.52	4.o5

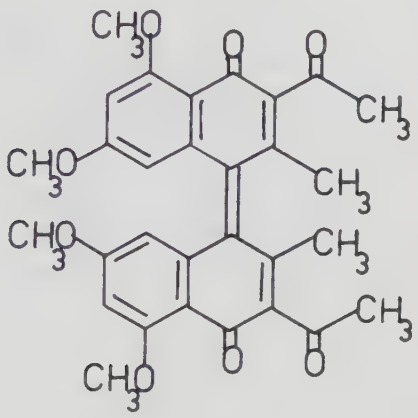
Das NMR-Spektrum von Fraktion V1/2 zeigte erstaunlicherweise ein Gemisch (1:1) der beiden Isomere, das sich auch bei erneutem Auftragen auf die HPLC-Säule nicht auftrennen ließ; es lag also keine Mischfraktion von V1/1 und V1/3 vor.
Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung von V1 in V1/1 und ein Gemisch aus V1/2 und V1/3 konnte mit dem Laufmittel Benzol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 75:24:1 erreicht werden.

Anhand der für 2-Hydroxyrufoolivacin vorgeschlagenen Struktur läßt sich das im MS auftretende Fragmention m/e 518 mit der durch Hochauflösung ermittelten Zusammensetzung $C_{30}H_{30}O_8$ wie folgt erklären. In der möglichen mesomeren o-Chinonstruktur 63 sollte die Biarylbindung unter den Bedingungen des Massenspektrometers spaltbar sein.



63

Das durch Kopplung zweier Naphthalinhälften entstehende Dimere 64 entspricht in seiner Hydrochinonform dem Fragmention m/e 518.



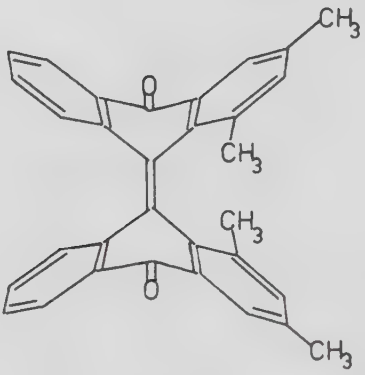
64

Dieses Dimere konnte bisher nicht als natürlicher Inhaltsstoff in C.RUFOOLOVACEUS nachgewiesen werden.

4.6. Zur Stereochemie von 2-Hydroxyrufoolivacin

Wie aus dem Molekülmodell ersichtlich ist, müssen die Rufoolivacinderivate extrem sterisch gehindert sein. Die Struktur des ebenfalls sterisch gehinderten Tetra - methyldianthrons 65 wurde schon vor längerer Zeit röntgenographisch bestimmt.[41]. Danach weicht im Dianthron das Molekül der gegenseitigen Behinderung der Methylgruppen

dadurch aus, daß sich eine Molekülhälfte nach oben und die andere nach oben faltet.

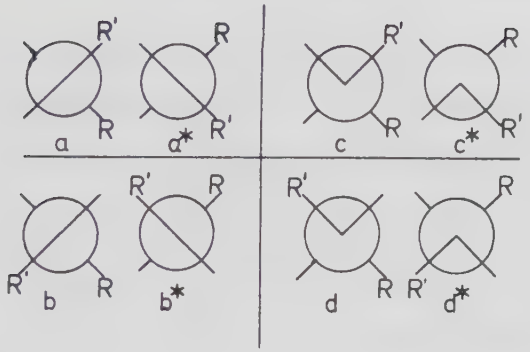


65

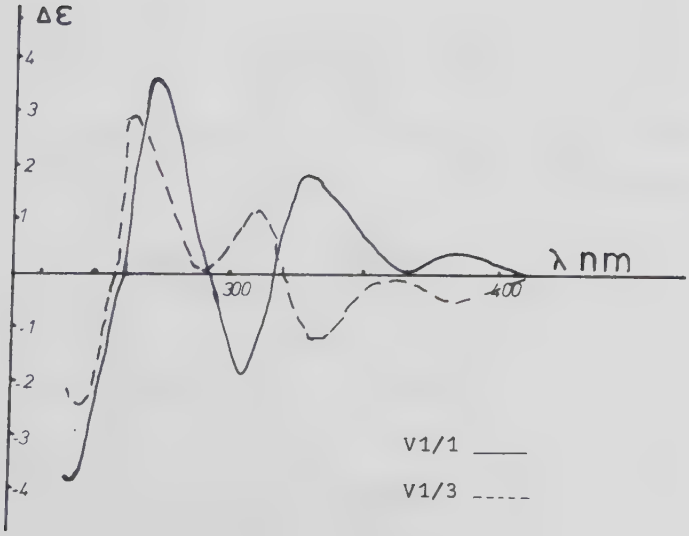
Nach Kessler[42] sind für derartige,sterisch gehinderte Ethylene gefaltete und verdrillte Strukturen möglich. Jede von ihnen zeigt E,Z-Isomerie, was zu vier Diastereomeren führt,die jeweils chiral sind.
In Schema 8 sollen die vier möglichen Strukturen und ihre entsprechenden Enantiomere schematisch dargestellt werden.

Überträgt man nun diese Modelle auf 2-Hydroxyrufoolivacin so kann man annehmen, daß die beiden isolierten Formen V1/1 und V1/3 zwei solcher diastereomer Formen entsprechen könnten, z.B der'gefalteten Form' a und der 'verdrillten Form' c.

Schema 8 (nach Kessler[42])



In Abb. 14 sind die CD-Kurven von V1/1 und V1/3 dargestellt (in Acetonitril)



Für die mittlere Fraktion V1/2 konnte bisher keine plausible Erklärung gefunden werden. Möglicherweise liegt ein Komplex der beiden Diastereomeren vor.

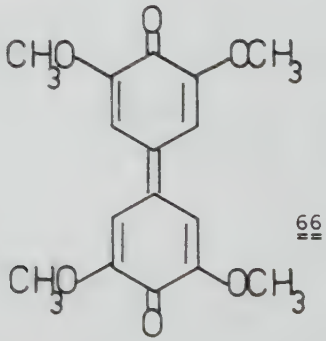
Das Auftreten zweier isomerer Formen von 2-Hydroxyrufoolivacin neben sterisch einheitlichem Rufoolivacin bestätigt wieder die von Shibata[11] aufgestellte Vermutung, daß die Dimerisierung über oxidative Phenolkopplung nicht stereospezifisch ablaufen muß.

Die Chemie und vorallem die sehr interessante Stereochemie der roten Farbstoffe aus C.RUFOOLIVACEUS sollte bei späteren Aufarbeitungen des Pilzes noch genauer untersucht werden.

4.7. Zur Biosynthese der roten Farbstoffe

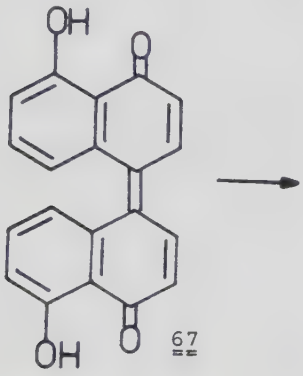
In der Literatur sind nur wenige Naturstoffe mit der ungewöhnlichen Diphenochinon-Struktur beschrieben.

Bereits seit 1oo Jahren ist das blaue Coerulignon (66) bekannt[43].

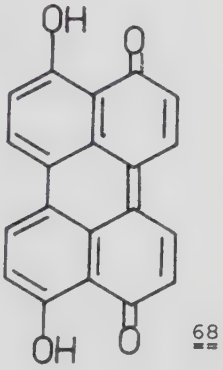


66

4,4'-Binaphthyl-1,1'-chinon (67) aus DALDINIA CONCENTRICA[44] geht leicht über in das Perylenchinon 68.

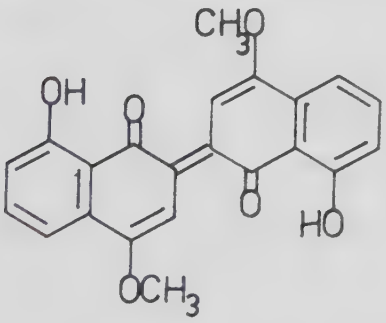


67



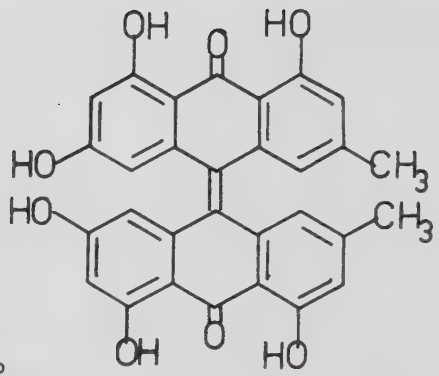
68

Das blaue 2,2'-Binaphthyl-1,1'-chinonderivat 69 wurde von Musgrave[45] aus DIOSPYROS BUXIFOLIA isoliert.



69

Hypericodehydrodianthron 70 ist eine aus HYPERICUM HIRSUTUM isolierte Zwischenstufe der Biosynthese des Hypericins[35].

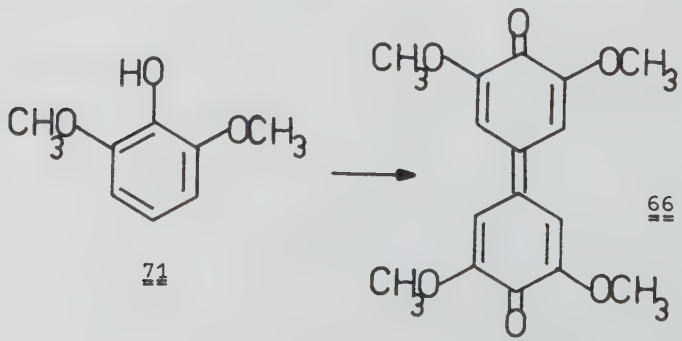


70

Für diese Diphenochinone wird ein Biosyntheseweg über oxidative Phenolkopplung vorgeschlagen[46].

Ist das Potential des Oxidationsmittels hoch genug, so entstehen aus den in den möglichen o- und p- Positionen verknüpften Dimeren die entsprechenden o,o' bzw. p,p'-Diphenochinone. So konnte man nachweisen, daß POLYPORUS VERSICOLOR ein Enzym, die Laccase, besitzt, das diese Reaktion katalysiert[46,47]:

Durchleiten von Luftsauerstoff durch eine Lösung von 2,6-Dimethoxyphenol (71) in einem Acetatpuffer (pH=4) ergibt in Gegenwart des Enzyms Laccase das Diphenochinon Coerulignon (66).

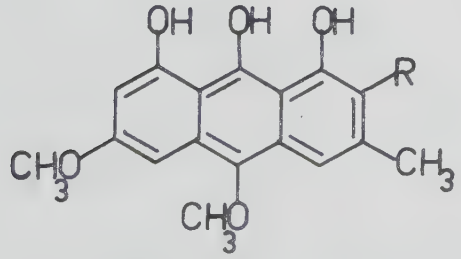


71

66

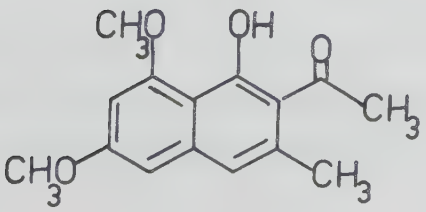
Auch aus einer höheren Pflanze, RHUS VERICIFERA, konnte ein Enzym mit gleicher Aktivität isoliert werden[48]. Dieses Enzym benötigt aber einen optimalen pH-Bereich von 6,8 - 7,4 im Gegensatz zum pH-Bereich 3,6 - 5,2 für das Pilzenzym. Die Autoren[48] schlossen daraus, daß beide Enzyme unterschiedliche Funktionen besitzen:
Das Pflanzenenzym arbeitet unter physiologischen Bedingungen; es verhindert z.B. die intracelluläre Bildung von Lignin. Dem Pilzenzym kommen dagegen extracelluläre Aufgaben zu z.B. die Beseitigung von toxischen Phenolen aus dem Medium, in dem die Pilze unter natürlichen Bedingungen leben.

Die Biosynthese der roten Farbstoffe aus C.RUFOOLIVACEUS sollte dementsprechend über eine Phenoloxidation der Anthracenderivate 72 und 73 und des Naphthalins 59 verlaufen.



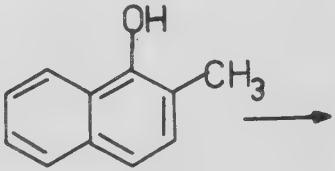
72 R = H

73 R = OH

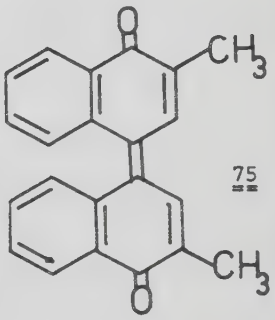


59

Arbeiten von B.R.Brown und A.H.Todd[49] haben gezeigt, daß 2-Methyl-1-naphthol(74) mit Laccase aus P.VERSICOLOR oder auch mit wäßrigem Kaliumferricyanid glatt in 3,3'-Dimethyl-1,1'-dinaphthyl-4,4'-chinon (75) übergeht.

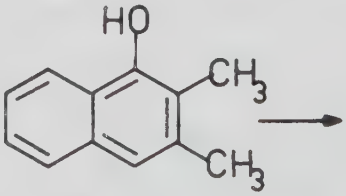


74

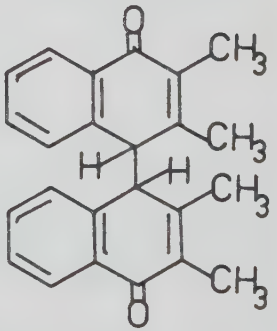


75

Die Oxidation von 2,3-Dimethyl-1-naphthol (76) bleibt dagegen wegen sterischer Hinderung auf der Stufe des Dinaphthons 77 stehen.



76



77

Dieses sollte eigentlich auch für die sterisch gehinderten Ausgangsstoffe der Phenolkopplung zu Rufoolivacin bzw. 2-Hydroxyrufoolivacin gelten, so daß ihre Biosynthese bisher nicht mit Sicherheit vorauszusagen ist.

4.8. Aufarbeitung von frischen Fruchtkörpern von C.RUFOOLIVACEUS

Die im Herbst 1979 bei Karlstadt/Main gesammelten Pilze konnten sofort aufgearbeitet werden.

Die grau-violetten Fruchtkörper ergaben mit Methanol einen zunächst blaß-braunen Extrakt, der sich erst nach ungefähr 15 Minuten rot verfärbte und dann das gleiche chromatographische Bild bot, wie die beschriebene Aufarbeitung.

Setzte man zum Methanol eine gewisse Menge Ascorbinsäure zu, so blieb der Extrakt blaß braungelb bis grünlich und zeigte unter der UV-Lampe (λ= 366 nm) eine intensive hellgrüne Fluoreszenz.

Diese Fluoreszenz konnte einer Substanz zugeschrieben werden, die auf dem Chromatogramm zunächst farblos war, sich aber nach kurzer Zeit rot färbte.

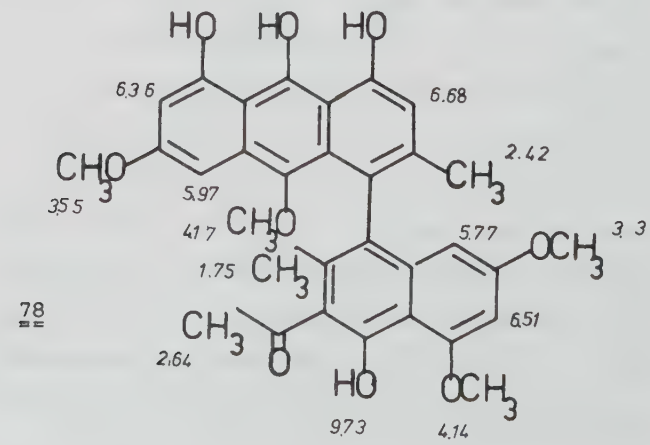
Der mit Methanol/Ascorbinsäure gewonnene Rohextrakt zeigte außer den bereits bekannten neutralen Anthrachinonen Physcion (38) und Physcion-8-methylether (39) und dem farblosen Torachrysonmethylether (59) weitere farblose Substanzen, die sich auf der DC-Platte oder in methanolischer Lösung nach kurzer Zeit rot färbten. Da sie aber sehr instabil waren und zum Teil nur in sehr geringen Konzentrationen anfielen, wurde zunächst nur die stark fluoreszierende Verbindung untersucht.

Ihre Abtrennung gelang mit Hilfe der Säulenchromatographie an Kieselgel, die allerdings wegen der Aggressivität des

Chromatographiematerials sehr verlustreich war. Rechromatographie an Sephadex LH2o mit Methanol und Auskristallisieren aus Essigester/Petrolether führte zu einem blaßgrünlichen, mikrokristallinen Pulver.

4.9. Strukturaufklärung des Fluoreszenzstoffs

Das NMR-Spektrum zeigt im Aromatenbereich vier Dubletts (J =2,5 Hz), die nach Einstrahlexperimenten metaständigen Protonen bei δ= 5.77 und 6.51 bzw. 5.97 und 6.36 ppm zuzuordnen sind.
Ein angespaltenes Singulett bei δ= 6.33 koppelt mit einem CH_3-Signal bei 2.42 ppm. Ein weiteres CH_3-Signal bei 2.64 und vier Methoxygruppen bei 4.17, 4.14, 3.53 und 3.33 erinnern an die NMR-Daten von Rufoolivacin.
Daher wird für das fluoreszierende Pigment die Struktur 78 vorgeschlagen.

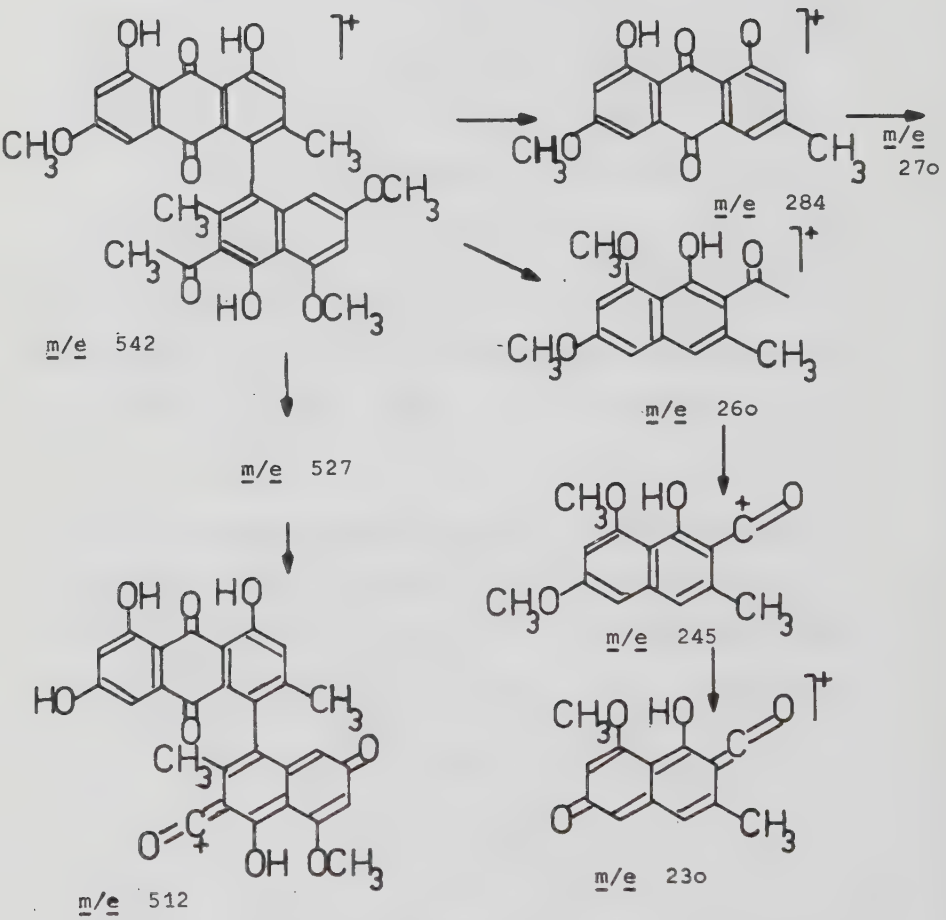


78

Eine Bestätigung dieser Struktur brachte die Oxidation des Pigments zu Rufoolivacin:
Ließ man seine methanolische Lösung stehen, so verfärbte sie sich nach kurzer Zeit rot. Das DC dieser Lösung zeigte einen roten Substanzfleck, der nach R_F-Wert und Anfärbereaktionen mit dem roten Pigment identisch war.
Andererseits ließ sich Rufoolivacin mit Zinkstaub und Eisessig zu einer farblosen Substanz reduzieren, die die gleiche Fluoreszenzerscheinung zeigte wie das neue Pigment. Das Reduktionsprodukt war jedoch so instabil, daß es sich bereits nach wenigen Minuten wieder in das rote Pigment umwandelte.

Das Massenspektrum zeigte nicht den nach der Summenformel erwarteten Molpeak m/e 558, sondern m/e 542 mit den Fragmentionen m/e 527, 512 und 485. Außerdem traten im halben Massenbereich Peaks mit m/e 284, 27o, 26o, 245 und 23o auf. Das Zerfallsmuster des Leucorufoolivacin kann man nach folgendem Schema erklären.

Schema 9 MS von Leucorufoolivacin



Es stellt sich nun nach der Aufarbeitung der frischen Fruchtkörper die Frage, ob die isolierten roten Farbstoffe Rufoolivacin (61) und 2-Hydroxyrufoolivacin (62)Artefakte sind, d.h. erst durch Oxidation der eigentlich in der Leucoform vorliegenden Pilzinhaltsstoffe entstehen,

oder ob die neue Aufsammlung eine anderspigmentierte Varietät von C.Rufoolivaceus darstellt.
Nach Angabe von Herrn Oertel könnte es sich bei dem Material aus Franken um C.r., var. pallidus handeln.

5. Aufarbeitung von Kulturen von C.ORICHALCEUS

5.1. Isolierung der Pigmente

Durch die freundliche Unterstützung von Prof. Moser konnte das Pigmentmuster der Mycelkulturen von C.ORICHALCEUS, dem Blutroten Klumpfuß, untersucht werden.
Zur Verfügung standen ungefähr 6o Schrägagarkulturen mit dunkelgelber bis rotbrauner Pigmentierung, die zunächst mit destilliertem Wasser aus den Reagenzgläsern gelöst wurden. Erschöpfende Extraktion mit Essigester ergab ein rotbraunes Pigmentrohgemisch.
Das DC des Rohextrakts (Kieselgel,'saures Laufmittel') zeigte zwei intensiv gelbe Substanzflecken und eine rote Substanz, außerdem eine undefinierbare, vom Startfleck hochziehende , rotbraune Zone.
Nach ersten Vorversuchen von S.Hinze trennten sich die Pigmente an acetyliertem Polyamid und an Cellulose nur unvollständig auf.
Die Chromatographie an Kieselgel trennte zwar die gelben und die rote Substanz sehr gut auf, war aber aufgrund der Komplexierung des roten Pigments mit dem Chromatographiematerials sehr verlustreich.
Mit Hilfe einer Rechromatographie über präparative Dickschichtplatten und Kristallisation aus Essigester/Petrolether ließen sich die Substanzen Gelb 1, Gelb 2 und CO-V1 in reiner Form gewinnen.

5.2. Identifizierung der Pigmente

Durch DC-Vergleich mit authentischen Proben, UV- und MS-Spektren wurden die gelben Pigmente Gelb 1 und Gelb 2 mit Physcion (38) und Physcion-8-methylether (39) identifiziert.

Das rote Pigment CO-V1 wies in seinem chromatographischen Verhalten, seiner Farbe und seiner typischen, blauen Farbreaktion mit H_2SO_4 große Ähnlichkeit mit 2-Hydroxyrufoolivacin (62) auf. Das MS und das NMR-Spektrum dieses Pigments stimmte exakt mit den für CO-V1 ermittelten Werten überein.

Interessanterweise ließ sich der rote Farbstoff aus den Kulturen über HPLC ebenfalls in drei Fraktionen auftrennen, deren Retentionszeiten identisch mit denen von V1/1, V1/2 und V1/3 waren (s.Abb.13).

Das farblose Naphthalinderivat 59 aus C.RUFOOLIVACEUS, und Rufoolivacin konnten in den Kulturen nicht nachgewiesen werden.

6. ^{13}C-NMR-Spektren von Phlegmacien-Pigmenten

Aufgrund der sehr geringen Substanzmengen konnten von den Phlegmacien-Pigmenten meist nur breitbandentkoppelte ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen werden. Nur in einigen Fällen gelang die Protonen-off-resonance-Entkopplung. Daher ist zum Teil die Zuordnung der Signale nicht eindeutig gesichert.

Die Strukturen der vorgestellten grünen und gelben Phlegmacien-Pigmente lassen sich von einem 3,4-Dihydro-6,8,9-trihydroxyanthracen-1-on-system ableiten. Als Grundlage zur Interpretation der Spektren wurden aus einzelnen Strukturelementen Modellverbindungen konstruiert. Ausgehend von Tetralon, 1-Hydroxynaphthalin und 1,8-Dihydroxynaphthalin wurde mit Hilfe der ^{13}C-Verschiebungsinkremente für Benzol die verschieden substituierten Vergleichsverbindungen theoretisch berechnet.

Folgende Inkremente wurden eingesetzt[5o]:

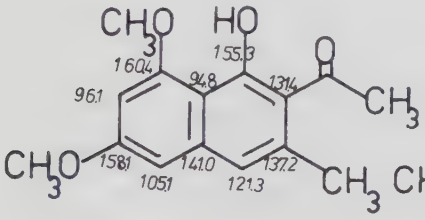
Substituent	1	ortho	meta	para
$-OCH_3$	31.3	-14.7	o.9	-8.1
$-OH$	26.9	-12.6	1.6	-7.6
$-CH_3$	9.3	o.6	o.o	-3.1
$-CH_2CH_3$	15.7	- o.6	-o.1	-2.8
$-COCH_3$	9.3	o.2	o.2	4.2
$-C_6H_5$	13.o	- 1.1	o.5	-1.o

Die zweite Hälfte der dimeren Strukturen wurde durch Einführung eines Phenylrestes an die möglichen Verknüpfungsstellen vereinfacht dargestellt.

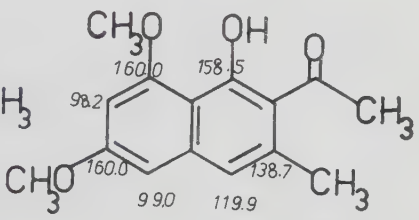
Es ergaben sich folgende Modellberechnungen:

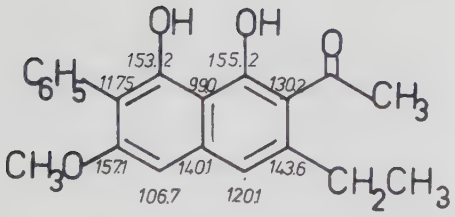
Torachryson-8-methylether (59)

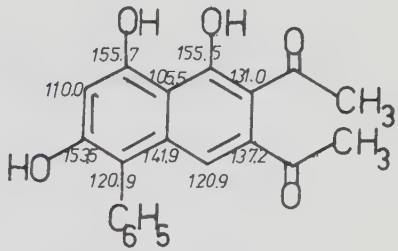
a) berechnet

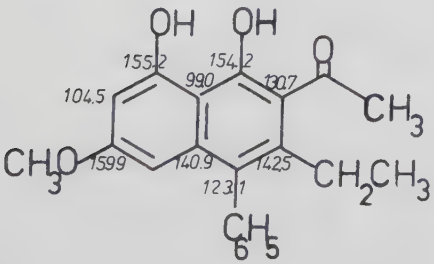


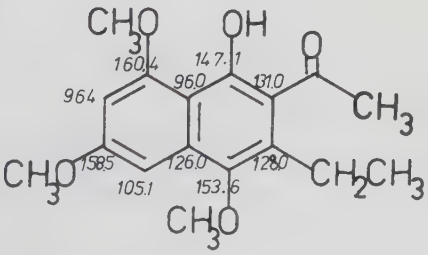
b) gemessen





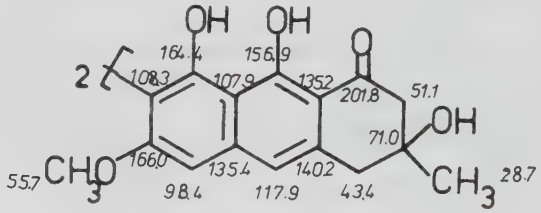




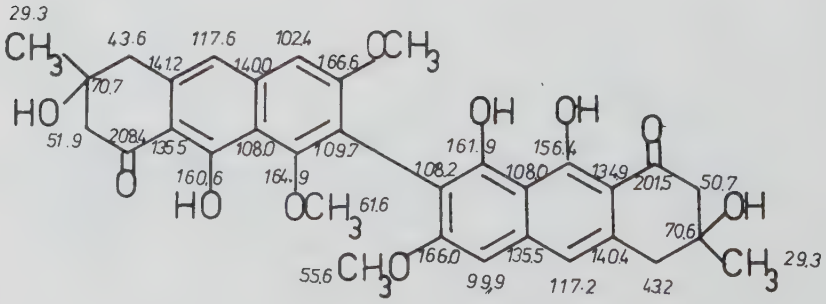


Entsprechend der durch Inkrementrechnung ermittelten Reihenfolge wurden nun die Signale für die aromatischen C-Atome zugeordnet; die Signale für alle nicht aromatischen C-Atome (C_1-C_4, CH_3 und OCH_3) ließen sich aufgrund ihrer chemischen Verschiebung eindeutig interpretieren.

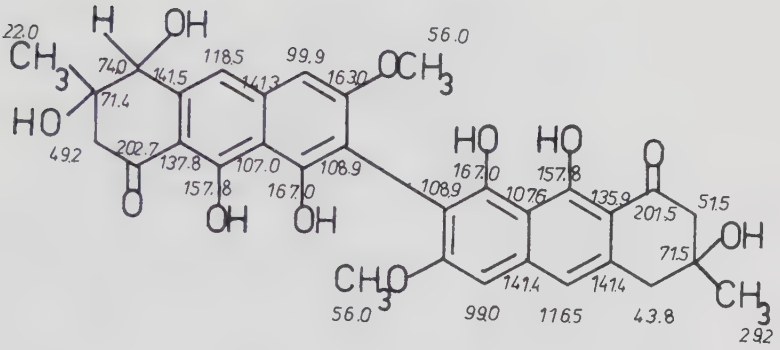
6.1. Flavomannin-6,6'-dimethylether (in $CDCl_3$)



6.2. Flavomannin-6,6',8'-trimethylether (in $CDCl_3$)

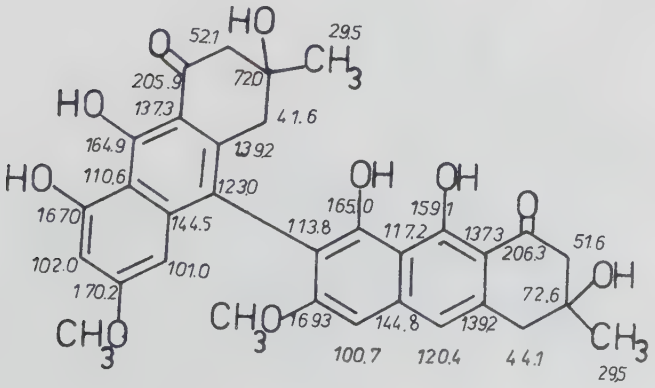


6.3. 4-Hydroxyflavomannin-6,6'-dimethylether (in $CDCl_3$)

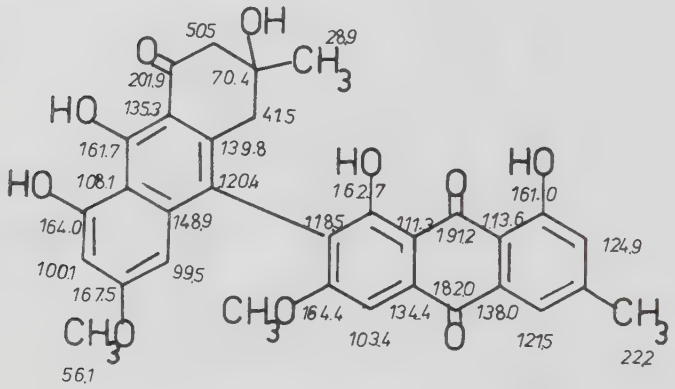


6.4. Phlegmacin (in $CDCl_3$)

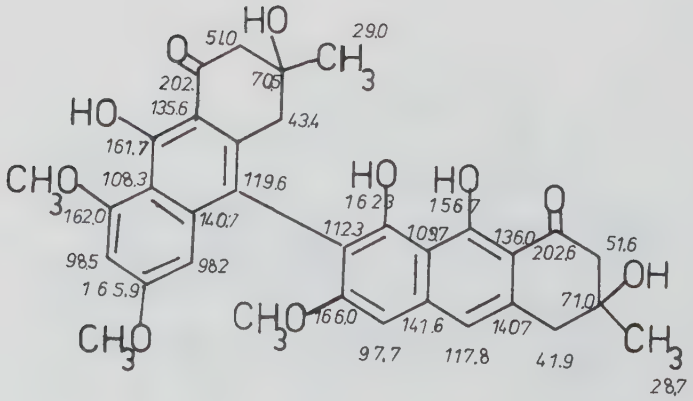
Die beiden Atropisomeren von Phlegmacin waren im ^{13}C-NMR-Spektrum durch Verdopplung bzw. Anspaltung einiger Signale deutlich zu erkennen.



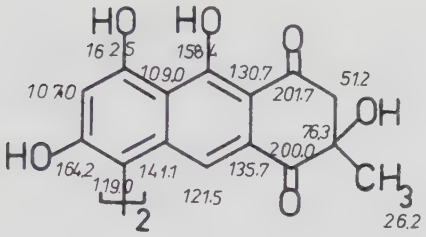
6.5. Anhydrophlegmacin-9,1o-chinon (in $CDCl_3$)



6.6. Phlegmacin-8'-methylether (in $CDCl_3$)

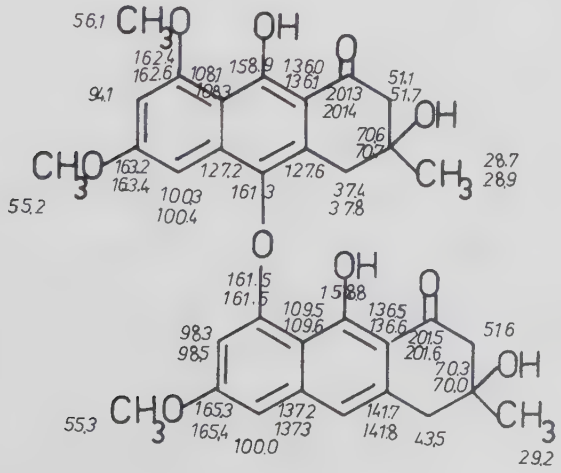


6.7. 4,4'-Dioxoatrovirin (in MeOD)



6.8. Cortinarin (in $CDCl_3$)

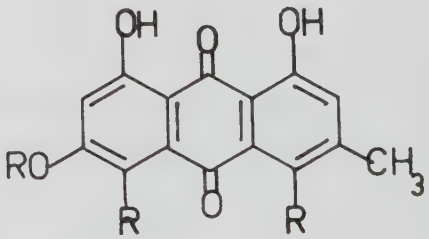
Auch im ^{13}C-NMR-Spektrum von Cortinarin äußerten sich die zwei stereoisomeren Formen durch die Verdopplung bzw. Anspaltung der Signale. Einige der C-Atome zeigten aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Anordnung der beiden Konformere deutliche Unterschiede in ihren chemischen Verschiebungen.



7. ^{13}C-NMR-Spektren von Anthrachinonen

In den letzten Jahren wurden von Höfle[51] und von Castonguay[52] ^{13}C-NMR-spektroskopische Untersuchungen von Anthrachinonen und ihren Polyhydroxyderivaten veröffentlicht. Mit Hilfe der dort angegebenen Zuordnungsparameter konnten die Spektren einiger Pilzanthrachinone weitgehend interpretiert werden.

Vermessen wurden die neutralen Anthrachinone Emodin (2o), Catenarin (51) und Xanthorin (79)[53]. Die von Höfle ermittelten Werte für Physcion (38) werden als Vergleich mit in die Tabelle aufgenommen.



2o	R_1, R_2, R_3 = H
38	R_1, R_3 = H R_2 = CH_3
51	R_1 = OH R_2, R_3 = H
79	R_1 = H R_3 = OH R_2 = CH_3

Von den aus C.ELEGANTIOR isolierten Anthrachinoncarbonsäuren konnten Dermolutein (35), Cortinarsäure (36) und 8-Methylcortinarsäure (37) spektroskopisch untersucht werden.

Tab. 4 ^{13}C-NMR-Spektren von Anthrachinonen

(in DMSO-d_6, 38 in $CDCl_3$)

	20	38	51	79	35	36	37
C-1	161.9	162.5	156.8	162.1	163.5	164.7	163.5
C-2	124.0	124.5	129.2	124.4	130.7	131.7	131.3
C-3	148.0	148.5	139.8	148.2	141.9	135.0	136.4
C-4	120.5	121.3	156.2	120.3	119.2	118.6	117.6
C-5	109.2	106.8	108.3	150.5	103.8	109.2	104.8
C-6	165.9	166.6	164.7	158.1	167.3	165.4	164.9
C-7	108.0	108.2	108.5	107.5	100.5	108.4	105.1
C-8	164.9	165.2	165.8	160.2	164.7	166.2	165.9
C-9	190.3	190.8	188.8	191.6	188.0	189.3	185.4
C-10	181.3	182.0	186.4	186.8	180.0	180.5	180.3
C-11	113.4	113.7	110.3	114.0	114.7	118.3	117.6
C-12	122.9	133.2	111.7	124.7	136.0	134.0	132.0
C-13	135.1	135.3	134.9	120.3	131.1	132.0	131.7
C-14	108.9	110.3	109.1	108.6	117.3	109.5	112.5
CH_3	21.7	22.2	15.8	21.7	19.4		
OCH_3		56.1		56.9	56.3		56.4
COOH					158.1	158.1 166.6	157.0 164.9

B. Die Farbstoffe aus ANTHRACOPHYLLUM-Arten und aus BOLETOPSIS LEUCOMELAS

1. Die Gattung ANTHRACOPHYLLUM

Nach Singer[54)] gehört die Gattung ANTHRACOPHYLLUM zur Familie TRICHOLOMATACEAE, Sektion COLLYBIA. Sie ist beheimatet in den Tropen oder in wärmeren Regionen gemäßigter Zonen.
Die Arten dieser Gattung wachsen meist auf Holz und werden als Holzzerstörer angesehen.
Charakteristisch ist die Pigmentierung dieser Pilze: Ihre bräunlich-zimtfarbenen bis dunkelmahagoniroten Farbstoffe lassen sich mit Alkohol extrahieren und verfärben sich nach Zusatz von KOH grün bis grünblau. Diese Farbreaktion ist auch beim Betüpfeln der Fruchtkörper mit KOH zu beobachten.

Es wurden zwei Arten dieser Gattung untersucht: ANTHRACOPHYLLUM DISCOLOR wurde von Steglich 1976 in Chile gesammelt, die gleiche Art fand Horak zusammen mit einer etwas größeren Art, die nach ihrer Herbarnummer als A.73/2o8 bezeichnet werden soll.

1.1. ANTHRACOPHYLLUM DISCOLOR (Montagne)Singer

1.1.1. Aufarbeitung der Pilze

Bedeckt man die unscheinbar braunen, getrockneten Fruchtkörper mit Aceton, so verfärbt sich die Lösung sofort intensiv orangegelb. Die vollständige Extraktion ausgehend

von 185 mg Trockenpilz ergab ein Pigmentrohgemisch von 68 mg. Auf dem Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel,'saures Laufmittel') trennte sich das Rohgemisch in ein gelbes Hauptpigment und zwei braune Nebenpigmente auf. Die beiden Nebenpigmente, nach fallendem R_F-Wert Braun 1 und Braun 2 genannt, nahmen während der Extraktion zu, so daß man annehmen mußte, daß es sich um Artefakte handelte.

Das gelbe Hauptpigment verfärbt sich über Ammoniakdampf zunächst grün, dann graublau bis violett, mit H_2SO_4 ergab sich eine uncharakteristische Braunfärbung.

Durch Chromatographie an Sephadex LH2o konnten die Pigmente voneinander getrennt und gereinigt werden.

1.1.2. Strukturaufklärung des gelben Hauptpigments

Der blaugraue Farbumschlag des gelben Hauptpigments mit NH_3 erinnert an Terphenylchinone wie Polyporsäure (8o) oder Atromentin (81), die sich über NH_3-Dampf blauviolett verfärben[33]. Die reversible Reduktions-/Oxidationsreaktion mit Dithionit bzw. Luftsauerstoff läßt auf ein chinoides System schließen. Diese Annahme wird auch durch das Massenspektrum bestätigt, in dem die Peaks für M^+ und M^++2 die typische Chinon-Hydrochinon-Beziehung anzeigen.

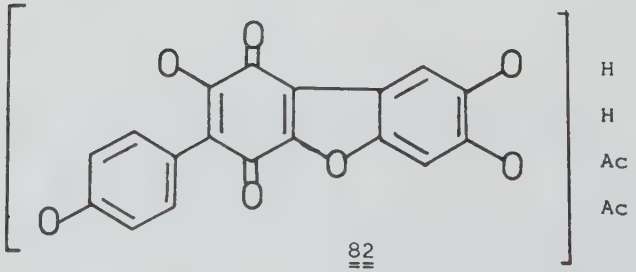
Zwei Ketenabspaltungen von M^+ m/e 422 bzw 424 zum Basepeak m/e 338 bzw. 34o und eine CO-Abspaltung zu m/e 31o sind die prominenten Fragmentionen im Massenspektrum.

Die Hochauflösung des Basepeaks m/e 338 ergibt eine Summenformel $C_{18}H_{10}O_7$; das gelbe Pigment stellt das Diacetat dieses Grundkörpers dar.

Das NMR-Spektrum (in Aceton-d_6) ist erstaunlich einfach. Im Aromatenbereich treten neben einem AA'BB'-Quartett (J =8Hz), zwei Singuletts auf, die - wie in einer verstärkten und gespreizten Aufnahme des Spektrums ersichtlich wird- mit J =1Hz aufgespalten sind. Außerdem liegen bei δ=2.24 und 2.34 ppm zwei Acetyl-Signale.

Danach sind ein para-disubstituierter und ein 2,3,5,6-tetrasubstituierter Phenylkern als Strukturelemente zu erkennen. Weitere wichtige Strukturhinweise brachte die Acetylierung zu einem Tetraacetat bzw. die reduzierende Acetylierung zu einem Leucohexaacetat.

Aus diesen Informationen läßt sich die Struktur 82 für das Pigment aus A.DISCOLOR ableiten, in der ein Sauerstoffatom eine Etherbrücke bildet und somit nicht acetylierbar ist.



82

1.1.3. Strukturaufklärung der braunen Nebenpigmente

Die spektroskopische Untersuchung der beiden braunen Nebenpigmente zeigte die enge Verwandtschaft zu dem Hauptpigment.
Braun 1 besitzt nach dem MS einen Molpeak m/e 382/380. von dem eine Ketenabspaltung zu m/e 340/338 ausgeht.
Es ist somit ein Monoacetat.
Aus dem NMR-Spektrum geht jedoch hervor, daß ein Gemisch der zwei möglichen Monoacetate vorliegen muß. Das Gemisch war chromatographisch nicht trennbar.
Das zweite braune Pigment mit dem Molpeak m/e 340/338 stellt das unacetylierte Grundsystem 83 des Hauptpigments dar. Sein NMR-Spektrum zeigt wie erwartet zwei Singuletts und das AA'BB'-Quartett (J =8 Hz).

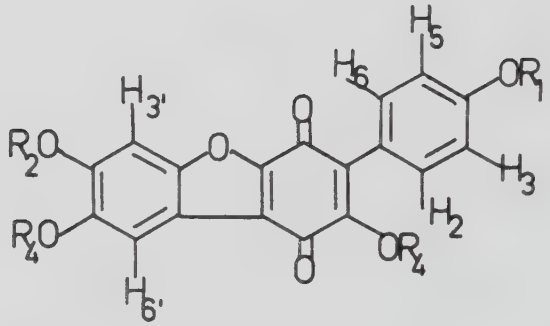
1.1.4. Bestimmung der Lage der Acetatgruppen durch Berechnung der Acetatverschiebung.

Vergleicht man die NMR-Spektren des nicht acetylierten braunen Pigments 83, des Hauptpigments 82 und des Peracetats 84, so kann mit Hilfe der empirisch aufgestellten Parameter für die Acetatverschiebung[56] das Substitutionsmuster theoretisch abschätzen.

Als Verschiebungsparameter $\Delta\delta$ werden eingesetzt:

o-	m-	p-
0.29	0.12	0.40

Die Bezeichnung der Protonen kann dem Formelbild entnommen werden.



83 R_1, R_2, R_3, R_4 = H

84 R_1, R_2, R_3, R_4 = Ac

85a R_1, R_3, R_4 = H R_2 = Ac

85b R_1, R_2, R_4 = H R_3 = Ac

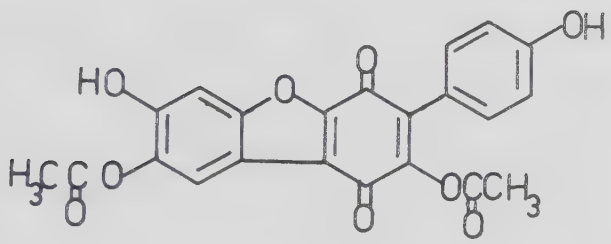
Tab. 5 Die chemischen Verschiebungen der Aromatensignale (in Aceton-d_6)

	H-5/H-3[+)]	H-6/H-2[+)]	H-3'	H-6'
83	6.88	7.37	7.22	7.46
84				
gef.	7.25	7.46	7.84	7.98
ber.	7.24	7.49	7.66	7.87
85a[++)]	6.88	7.37.	7.51	7.58
85b[++)]	6.88	7.37	7.34	7.75
82	6.95	7.25	7.37	7.77

+) AA'BB'-Quartett, J = 8 Hz

++) Werte theoretisch berechnet

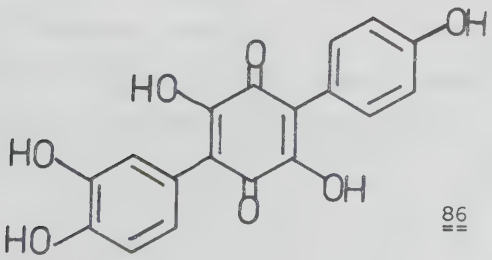
Mit diesen Berechnungen kann man die Lage der Acetatgruppen mit einiger Sicherheit angeben. Die Struktur des gelben Hauptpigments aus A.DISCOLOR vervollständigt sich damit zu 3-(4-Hydroxyphenyl)-2,7-diacetoxy-8-hydroxydibenzofuran (82).



82

1.1.5. Synthese von Braun 2 83 ausgehend von Leucomelon (86)

Bereits 1942 isolierte Akagi[57] aus BOLETOPSIS LEUCOMELAS ein braunes Pigment, Leucomelon, und formulierte dafür nach Derivatisierungs- und Spaltungsreaktionen folgende Struktur 86



86

Die Ähnlichkeit mit dem ANTHRACOPHYLLUM-Pigment ist offensichtlich. Durch oxidative Kopplung des endständigen 3,4-Dihydroxyphenylkerns mit der Hydroxygruppe am Chinonkern sollte Leucomelon in das neue Pigment zu überführen sein[58]. Die Umsetzung gelang bereits unter milden Bedingungen:

Synthetisches Leucomelon[59] wurde in THF gelöst und mit Ag_2CO_3/Celite bzw. Ag_2O einen Tag lang bei Raumtemperatur stehengelassen.

Das Chromatogramm des Reaktionsgemischs zeigte ein Hauptprodukt, das nach R_F-Wert und Anfärbereaktion identisch war mit dem unacetylierten Nebenpigment Braun 2.

Das Reaktionsprodukt wurde isoliert und an Sephadex LH2o mit Methanol/Wasser 7:3 gereinigt.

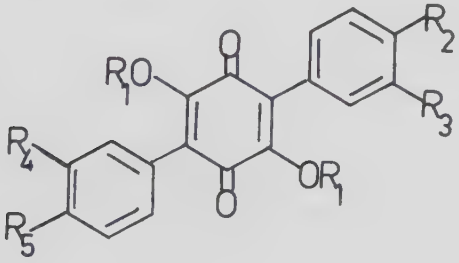
Die spektroskopischen Daten und die vergleichende Peracetylierung des synthetischen und des natürlichen Materials bestätigte die Identität.

Das Pigment Braun 2 wurde aufgrund dieser Ergebnisse Cycloleucomelon genannt. Das Hauptpigment aus A.DISCOLOR ist demnach Cycloleucomelon-3,5-diacetat.

1.1.6. Terphenylchinone aus Höheren Pilzen

Terphenylchinone wie Polyporsäure (8o) und Atromentin (81) sind schon seit vielen Jahren bekannt[33]. In z.T. erstaunlich großen Mengen konnten sie aus den Fruchtkörpern einiger Porlinge isoliert werden. Der Samtfußkrempling,

PAXILLUS ATROTOMENTOSUS z.B. enthält bis zu 3,6% seiner Trockenmasse Atromentin in der Leucoform. Aurantiacin (87), das orangerote Pigment aus HYDNELLUM-Arten ist das Dibenzoat von Atromentin. Das bereits erwähnte Leucomelon vermutete Akagi[57] in B.LEUCOMELAS, das 'hypothetische' Chinon Variegatin (88) wurde bisher nicht in der Natur nachgewiesen. Edwards[60] fand, daß synthetisches Variegatin sich in wenigen Minuten umwandelt zu Thelephorsäure(89), einem sehr schwerlöslichen, blauschwarzen Pigment, bekannt aus THELEPHORA- und HYDNELLUM-Arten.[61]

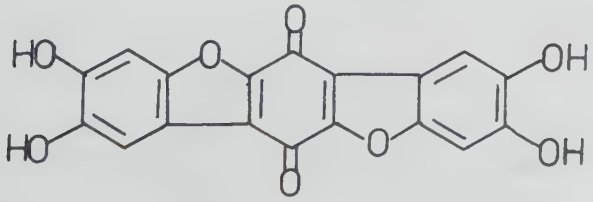


80 R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = H

81 $R_1; R_3, R_4$ = H R_2, R_5 = OH

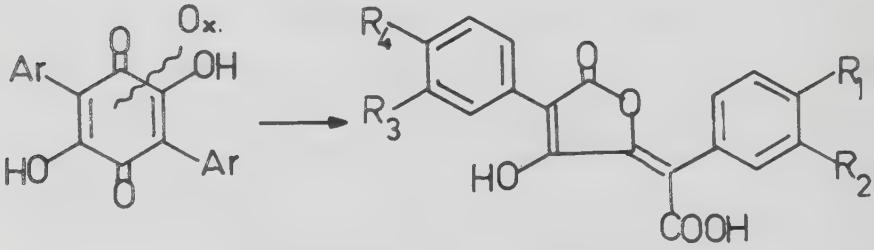
87 $R_4; R_3$ = H R_2, R_5 = OH R_1 = $OCOC_6H_5$

88 R_1 =H R_2, R_3, R_4, R_5 = OH



89

Eine typische Reaktion der Terphenylchinone ist die oxidative Ringöffnung zu Pulvinsäuren wie Pulvinsäure (90), Atromentinsäure (91) oder Variegatinsäure (92).



90 R_1, R_2, R_3, R_4 = H

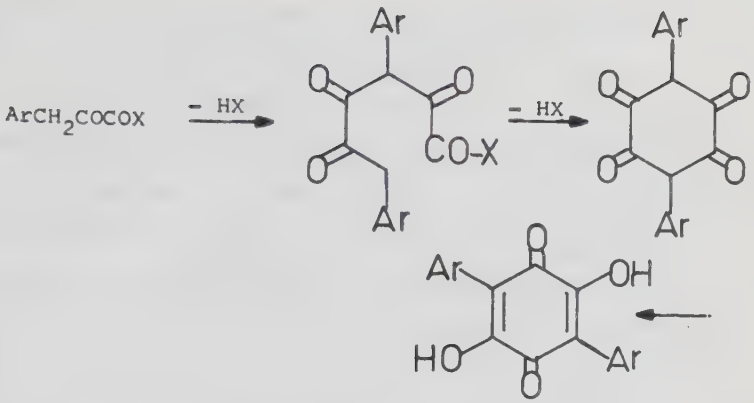
91 R_2, R_3 = H R_1, R_4 = OH

92 R_1, R_2, R_3, R_4 = OH

Pigmente vom Pulvinsäuretyp sind verantwortlich für die auffallenden roten und gelben Farben der Fruchtkörper von Boleten [33].

1.1.7. Die Biosynthese der Terphenylchinone

Biosynthetisch entstehen die Terphenylchinone durch Kondensation zweier Moleküle aktivierter Arylbrenztraubensäure über eine Triketosäure als Zwischenstufe.



1.2. ANTHRACOPHYLLUM 73/2o8

1.2.1. Aufarbeitung der Pilze

Ähnlich wie A.DISCOLOR gaben auch die getrockneten, bräunlichen Fruchtkörper der größeren ANTHRACOPHYLLUM-Art mit Aceton eine intensiv gefärbte Farblösung. Die erschöpfende Extraktion lieferte einen dunkelgelben Rohextrakt,der zunächst dünnschichtchromatographisch mit dem Extrakt der verwandten Art verglichen wurde. Während A.DISCOLOR neben einem gelben Hauptpigment nur zwei Nebenpigment enthielt,trennte sich das Farbgemisch von A.73/2o8 in mindestens sieben gelbe und braune Substanzflecken auf, darunter die drei Pigmente aus A. DISCOLOR. Am Startfleck blieb außerdem eine grau-violette Substanz zurück.

Alle Substanzen zeigten mit NH_3 einen Farbumschlag nach Graugrün bis Grau-blau. Einige der Flecken verfärbten sich auch ohne NH_3 nach längerem Liegen auf dem DC graublau.

Ließ man den Aceton-Extrakt einige Zeit stehen, so schied sich ein blauschwarzer Niederschlag ab, der nach DC-Vergleich mit einer authentischen Probe und den UV- bzw. NMR-Spektren als Thelephorsäure (89) identifiziert werden konnte. Da im Laufe der Aufarbeitung immer mehr Thelephorsäure gewonnen wurde, war anzunehmen, daß sich im Rohextrakt ein direkter Vorläufer von Thelephorsäure befinden mußte.

1.2.2. Isolierung der Pigmente

Durch Chromatographie an acetyliertem Polyamid gelang die Auftrennung des Rohgemischs in eine gelbe und eine braune Fraktion.

Die gelbe Fraktion stellte ein Gemisch von zwei Substanzen dar, die chromatographisch nicht mehr trennbar waren und im Gemisch spektroskopisch untersucht wurden.

Die braune Fraktion dagegen konnte an Sephadex LH20 in drei braune Hauptfraktionen getrennt werden:

Mit Methanol gewann man zunächst eine braune Substanz, die nach DC-Vergleich und MS- bzw. NMR-Spektren identisch war mit Cycloleucomelon-monoacetat, dem Pigment Braun 2 aus A.DISCOLOR. Anschließend wurde ein aubergine-farbenes Pigment eluiert, gefolgt von einer braunen Substanz, die als Cycloleucomelon (83) identifiziert werden konnte.

1.2.3. Strukturaufklärung des aubergine-farbenen Pigments

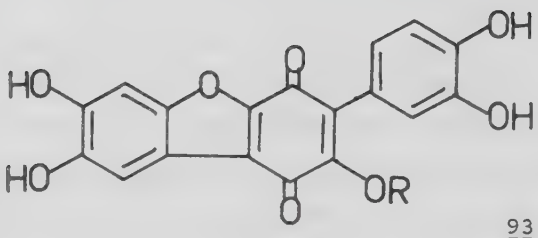
Durch Rechromatographie an Sephadex LH2o mit Methanol/Wasser 7:3 konnte das Pigment gereinigt werden; aus Essigester/Petrolether fiel es als bräunliches, amorphes Pulver aus. Seine rotbraune Lösung erwies sich als äußerst instabil: bereits nach kurzer Zeit schied sich Thelephorsäure als blauschwarzer Niederschlag ab.

Aus dem Dünnschichtchromatogramm der Lösung war ersichtlich, daß ein weiteres braunes Pigment mit einem kleineren R_F-Wert entsteht, das sich auf dem Plättchen sehr schnell blau färbt.

Das MS des aubergine-farbenen Pigments zeigt einen Molpeak m/e 396 und eine Ketenabspaltung zum Basepeak m/e 354. Die Hochauflösung des Basepeaks ergab eine Summenformel $C_{18}H_{1o}O_8$. Sie unterscheidet sich von der Formel für Cycloleucomelon durch ein zusätzliches Sauerstoffatom.

Im NMR-Spektrum (in Aceton-d_6) treten im Aromatenbereich neben zwei Singuletts (7.14 und 7.43 ppm) zwei Multipletts bei δ= 6.88-7.o3 (m,1H) und 6.75-6.84 ppm (m,2H) auf. Demnach könnte die Verbindung als Strukturelemente einen in 1,2,4,5-Stellung substituierten und einen 1,3,4-trisubstituierten Phenylkern enthalten. Das Methylsignal einer Acetylgruppe erscheint bei 2.22 ppm.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird für das Pigment die Struktur **93** vorgeschlagen.



93 R = Ac

94 R = H

Die Bildung von Thelephorsäure aus dieser Verbindung sollte nach Abspaltung der Acetylgruppe am Benzochinonkern sehr leicht möglich sein. Im Vergleich zu Variegatin, dem 'hypothetischen' Chinon 88, wurde die Verbindung 93 Cyclovariegatin-monoacetat genannt. Das bei der Umsetzung zu Thelephorsäure entstehende braune Pigment war vermutlich das unacetylierte Cyclovariegatin (94), das jedoch nicht isoliert werden konnte.

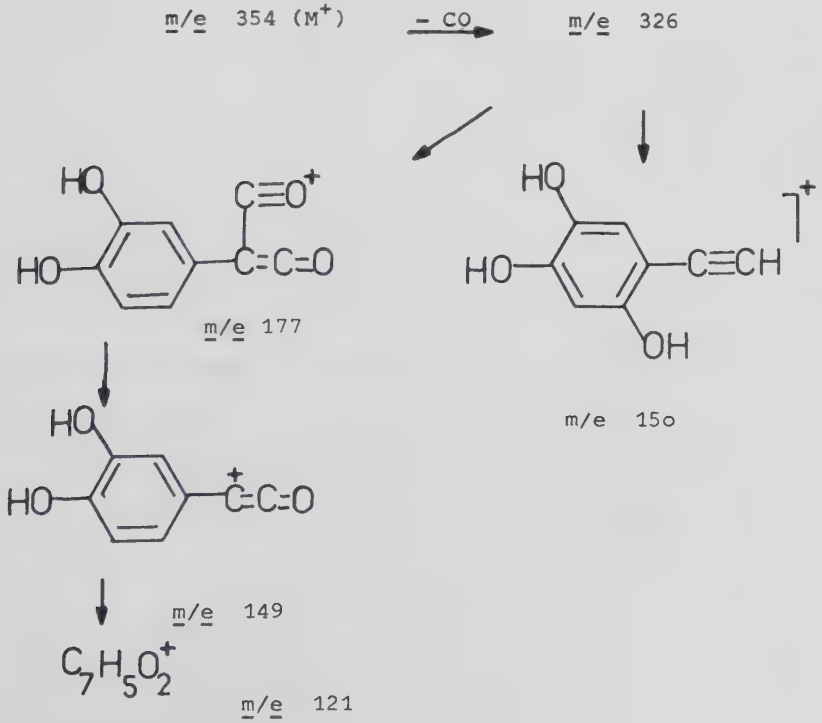
1.2.3. Vergleich von Cyclovariegatin mit einem aus SUILLUS GREVILLII isolierten Thelephorsäurevorläufer und mit synthetischem Material

1975 isolierte Edwards[60] Cyclovariegatin aus SUILLUS GREVILLII, dem Lärchenröhrling. Edwards beschreibt das rotbraune Pigment, das er C_2 nannte, in seinen spektroskopischen Daten und Eigenschaften im Vergleich zu Terphenylchinonen wie Polyporsäure (80), Atromentin (81), synthe-

tischem Leucomelon (86) bzw. Variegatin und vorallem mit Thelephorsäure (89). Das Massenspektrum von 'C_2' zeigt die typischen Fragmentierungen der Terphenylchinone:

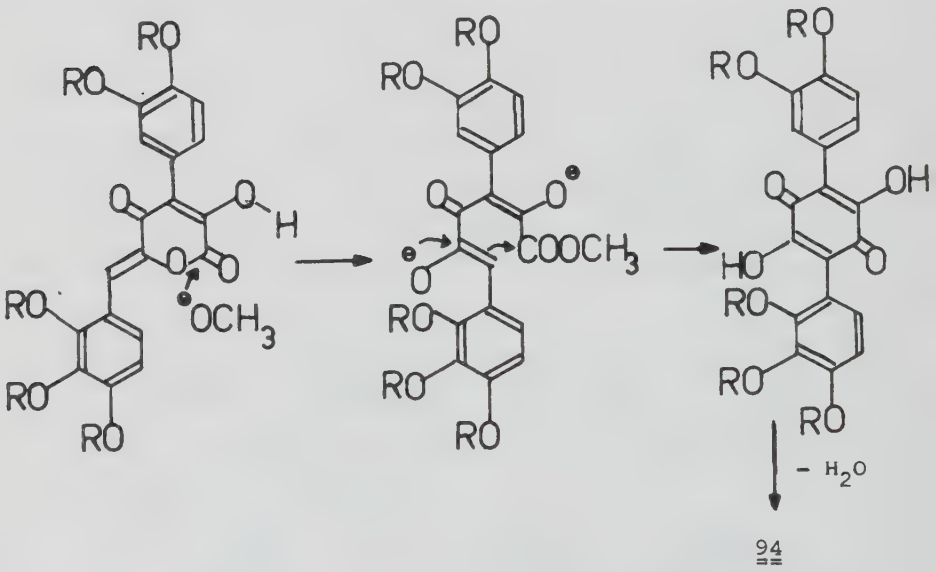
Neben den Peaks für M^+ m/e 354 und M^+-CO m/e 326 tritt ein Ion m/e 177 auf, das durch Abspaltung der Dihydroxyphenylseite des Chinons entsteht. Von diesem Fragment leiten sich die Ionen m/e 149 und 121 ab. Das typische Phenylacetylenfragment m/e 15o bildet sich durch Spaltung des Dibenzofuransystems.

Schema 1o Massenspektrum von Cyclovariegatin



In seiner Doktorarbeit entwickelte Lohrisch[59] eine Methode zur Synthese von Grevillinen und ihre Umwandlung in Terphenylchinone.

Das allgemeine Reaktionsschema umgeformt für den Fall des Cyclovariegatin kann wie folgt dargestellt werden:



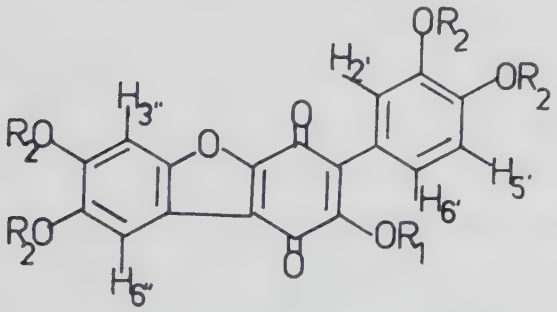
94

Auf diesem Weg hergestelltes synthetisches Cyclovariegatin wurde an Sephadex LH20 mit Methanol/Wasser 7:3 gereinigt. Es ist ein braunes Pulver, das in seinem R_F-Wert und seinen Anfärbereaktionen identisch ist mit dem bei der Umwandlung des aubergine-farbenen Pigments zu Thelephorsäure beobachteten Zwischenprodukt.

1.2.3.1. Vergleich der NMR-Spektren

Die Signale des NMR-Spektrums für das synthetische Material stimmen gut mit den für Cyclovariegatin-monoacetat gefundenen Werten überein, so daß mit einiger Sicherheit angenommen werden kann, daß sich die Acetatgruppe am Chinonkern befindet. Andernfalls sollte sich die Acetatverschiebung auf die Lage der aromatischen Protonen auswirken.

Die Peracetylierung des synthetischen Cyclovariegatins führt zu einem Pentaacetat, das nach DC-Vergleich, Ms (M^+ m/e 564 mit fünf konsekutiven Ketenabspaltungen) und NMR-Spektrum mit dem Pentaacetat des natürlichen Pigments identisch ist (95).



94 R_1, R_2 = H
95 R_1, R_2 = Ac
93 R_1 = Ac, R_2 = H

Tab. 6 NMR-Daten (in Aceton-d_6, 94 in Aceton/DMSO-d_6)

	H-3'	H-6'	H-6",5"	H-2"
93	7.14	7.43	6.75-6.84 (m)	6.88-7.03 (m)
94	7.15	7.40	6.75-6.85 (m)	6.95-7.02 (m)
95				
synth	7.82	7.85	7.24-7.33	7.33-7.40
natürl.	7.84	7.98	7.22-7.33 (m)	7.29-7.38 (m)

1.2.4. Strukturaufklärung der gelben Pigmente

Durch Chromatographie an acetyliertem Polyamid konnte, wie erwähnt, aus dem Rohextrakt eine gelbe Fraktion abgetrennt werden.
Die gelbe Fraktion enthielt zwei Substanzen, die auf dem DC sehr eng zusammen lagen. Nach R_F-Wert und Anfärbereaktion sollte der obere der beiden Substanzflecken identisch sein mit dem aus A.DISCOLOR isolierten gelben Pigment. Alle Versuche, die beiden Substanzen chromatographisch zu trennen, scheiterten, so daß die Strukturaufklärung von dem Gemisch ausgehen mußte.

Wie erwartet, zeigt das Massenspektrum mit den Peaks m/e 424/422, 382/38o, 34o/338 und 31o die bekannten Fragmente für das Cycloleucomelonderivat 82. Daneben treten ausgehend von M^+ m/e 482/48o drei Ketenabspaltungen zum Basepeak m/e 354 auf. Das zweite Pigment des Gemischs ist demnach ein Triacetat des Cyclovariegatins 96.

Die im unteren Massenbereich auftretenden Peaks m/e 177, 15o, 149 und 121 bzw. m/e 163, 135 und 1o5 lassen sich nach dem von Edwards[6o] beschriebenen Fragmentierungsmuster für Terphenylchinone zuordnen (s.Schema 1o)

Das NMR-Spektrum des Gemischs bestätigt eindeutig das Ergebnis der Massenspektroskopie:
Das AA'BB'-System des Cycloleucomelonderivats bei δ=6.93 und 7.26 (dd J = 8 Hz) wird z.T. von den beiden Multipletts

eines ABX-Systems bei 7.07 - 7.14 (m, 1H) und 7.28 - 7.33 ppm (m, 2H) überlagert. Interessanterweise fallen die Signale für das H-3' und H-6' der beiden Verbindungen zusammen. Die beiden Signale bei 7.35 (H-3',2H) und 7.75 ppm (H-6',2H) lassen darauf schließen, daß die Benzofuranhälften in ihren Substitutionsmustern übereinstimmen.

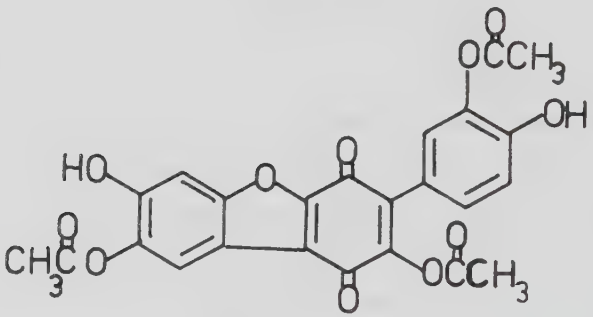
Die Lagen der Acetatgruppen von Cyclovariegatintriacetat (96) sollte, wie für Cycloleucmelonacetat beschrieben, durch Vergleich der NMR-Daten ermittelt werden.

Als Vergleichsverbindungen standen Cycloleucomelondiacetat (82), synthetisches Cyclovariegatin(94) und Cyclovariegatinperacetat (95) zur Verfügung. Mit Hilfe der Acetatverschiebungsparameter wurde versucht, die chemischen Verschiebungen der möglichen Acetate theoretisch abzuschätzen.

Tab. 7 NMR-Daten (in Aceton-d_6, 94 in Aceton/DMSO-d_6)

	H-3'	H-6'	H-3"5"	H-2"6"
82	7.55	7.75	6.93(d, J=8Hz)	7.26(d)
	H-3'	**H-6'**	**H-2"**	**H-5"6"**
94	7.15	7,4o	6.95-7.o2 (m)	6.75-6.84 (m)
95				
synth.	7.82	7.95	7.24-7.33	7.33-7.4o
natürl.	7.84	7.95	7.22-7.33 (m)	7.29-7.38 (m)
96	7.35	7.75	7.28-7.33 (m)	7.o7-7.14 (m)

Nach Vergleich der NMR-Signale für die Aromatenprotonen kann man für das zweite gelbe Pigment aus A.73/2o8 mit einiger Sicherheit die Struktur eines Cyclovariegatin-3,5'4"-triacetats (96) annehmen.



96

1.2.5. Diskussion der Ergebnisse

Die'große'ANTHRACOPHYLLUM-Art enthält demnach in recht hoher Konzentration Derivate des Cycloleucomelons und des Cyclovariegatins. Man kann vermuten, daß das Tri- bzw. Diacetat die eigentlichen Pigmente darstellen, und daß das Gemisch der monoacetylierten und unacetylierten Verbindungen im Laufe der Trocknung und der Aufarbeitung entstehen. Mit Sicherheit kann man aber annehmen, daß sich Thelephorsäure als Artefakt aus dem in Lösung sehr instabilen Cyclovariegatin gebildet hat, eine Beobachtung, die Edwards[6o] bereits bei der Aufarbeitung von SUILLUS GREVILLII machte.

Die Strukturaufklärung der Pigmente aus den ANTHRACOPHYLLUM-Arten wurde hauptsächlich mit Hilfe der MS und NMR-Spektren durchgeführt. Sie wurde wesentlich dadurch erleichtert, daß durch die Arbeiten von Lohrisch[59] synthetisches Vergleichsmaterial zur Verfügung stand.

2. Die Pigmente aus BOLETOPSIS LEUCOMELAS (Pers.ex Fr) Fayod

2.1. Der Pilz

BOLETOPSIS LEUCOMELAS, der Rußgraue Porling, ist durch seinen Namen (leuco-weiß, melas-schwarz) sehr anschaulich charakterisiert. Die grauschwarzgefärbte Huthaut bildet einen Kontrast zu der weißgefärbten Hutunterseite. Das Fleisch ist weiß, verfärbt sich aber an der Luft rot bis rotviolett-graubraun. Der relativ große, eßbare Porling ist nur gebietsweise verbreitet, vor allem in montanen Nadelwäldern.

2.2. Aufarbeitung der Pilze

Extrahiert man ein Stück eines frischen Fruchtkörpers von B.LEUCOMELAS mit Methanol, so verfärbt sich die zunächst farblose Lösung innerhalb kurzer Zeit intensiv grün bis grünblau. Das DC dieser Farblösung weist eine große Zahl farbloser, blauer, grüngrauer und brauner Substanzflecken auf. Extrahiert man dagegen mit Aceton, so erhält man einen relativ stabilen, schmutzigweißen Rohextrakt.

Zur Verfügung standen Pilze, die 1973 in Kaltenbrunn gesammelt wurden und in MeOH/HCl eingelegt in der Tiefkühltruhe aufbewahrt wurden; außerdem frische, 1979 gesammelte Exemplare.

Die frischen Pilze wurden gefriergetrocknet und im Soxhlett zunächst zum Entfetten mit Petrolether 4o-6o behandelt. Dann wurde mit Aceton erschöpfend extrahiert. Ausgehend von 5 g getrockneten Materials erhielt man 6oo mg eines schmutzig-weißen, kristallinen Rohextrakts.

2.3. Isolierung der Pigmente

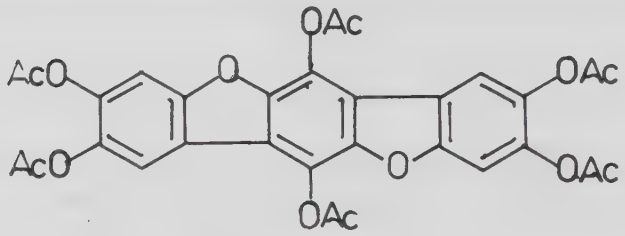
Es gelang, den Rohextrakt aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit in Essigester in zwei Fraktionen zu trennen.

Der sehr schwerlösliche, weiße Rückstand erwies sich als fast reine, kristalline Substanz, die aus Ethanol umkristallisiert werden konnte und spektroskopisch untersucht wurde.

Ihr Ms deutet mit sechs konsekutiven Ketenabspaltungen von M^+ m/e 6o4 zum Basepeak m/e 354 $\left[C_{18}H_{1o}O_8\right]$ auf ein Hexaacetat hin. Nach dem NMR-Spektrum mit nur zwei Aromatensignalen bei δ =7.68 (s,2H) und 7.61(s,2H) und zwei CH_3CO- Singuletts bei 2.51 (6H) und 2.36 ppm (6H) muß diese Verbindung hochsymmetrisch sein.

Die Verseifung des Hexaacetats mit K_2CO_3 in Methanol führte zu einem schwarzblauen, schwerlöslichen Produkt, das nach DC-Vergleich und UV-Spektrum als Thelephorsäure (89) identifiziert werden konnte. Demnach stellt die weiße Substanz aus B.LEUCOMELAS ein Thelephorsäureleucohexaacetat dar.(97)

Dieses Derivat, das zwar bereits von Kögl[62] und Gripenberg[61] im Laufe der Strukturaufklärung von Thelephorsäure beschrieben wurde, konnte bisher noch nicht als Naturprodukt nachgewiesen werden.



97

Die IR-Daten von Thelephorsäureleucoacetat (1760, 1460, 1375 und 1205 cm^{-1}) stimmen mit den von Gripenberg angegebenen Werten gut überein.
Wegen der extremen Schwerlöslichkeit der Substanz ist eine quantitative Bestimmung ihres Anteils in B.LEUCOMELAS nicht möglich. Im Acetonextrakt ist sie zu etwa 10% enthalten.

Die in Essigester lösliche Fraktion bestand nach dem DC aus vier dicht beieinander liegenden Substanzen, die unter der UV-Lampe (λ =264 nm) eine mehr oder weniger starke hellblaue Fluoreszenz zeigten. Die Isolierung der vier Substanzen gelang über präparative Dickschichtplatten (Kieselgel,'saures Laufmittel').

2.4. Strukturaufklärung der farblosen Substanzen

Die Verbindungen wurden nach fallendem R_F-Wert Bl-1, Bl-2, Bl-3 und Bl-4 genannt. Bl-2 und Bl-3 stellten die Hauptprodukte dar. Im Laufe der Aufarbeitung schien es, als ob der Anteil von Bl-1 abnehmen und der von Bl-4 zunehmen würde.

Da die Massenspektren aller vier Verbindungen Ketenabspaltungen zu einem Basepeak m/e 34o zeigten, lag die Vermutung nahe, daß sie Acetate einer Verbindung mit dem Molgewicht 34o und der Zusammensetzung $C_{18}H_{12}O_7$ darstellten.

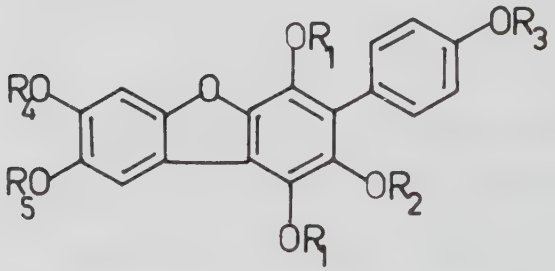
Die Peracetylierung einer kleinen Probe des Rohgemischs bestätigte diese Annahme: mit Acetanhydrid und einer Spur Schwefelsäure entstand ein Acetylierungsprodukt, das nach R_F-Wert und MS identisch mit Bl-1 war.

Das MS zeigte ausgehend von m/e 592 $\left[C_{3o}H_{24}O_{13}\right]$ sechs Ketenabspaltungen zu m/e 34o $\left[C_{18}H_{12}O_7\right]$.

Aufgrund dieser durch Hochauflösung ermittelten Summenformel und des NMR-Spektrums, das mit zwei Singuletts und einem AA'BB'-Quartett (J =8 Hz) im Aromatenbereich mit dem Spektrum für Cycloleucomelon (82) aus A.DISCOLOR vergleichbar ist, wurde für Bl-1 die Struktur eines Cycloleucomelon-leucoperacetat (98) vorgeschlagen.

Bl-2, das nach dem NMR-Spektrum (s.Tab.7) ein Gemisch aus Bl-1 und Bl-3 sein sollte, konnte auch nach erneuter

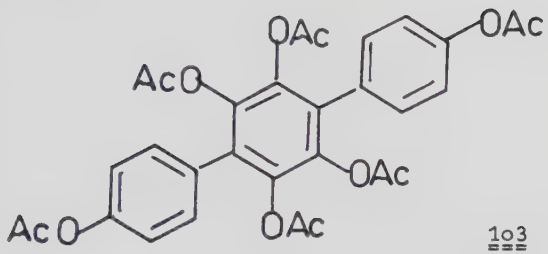
Chromatographie nicht getrennt werden.
Aus der Lage und der Integration der CH_3-Signale konnte man folgern, daß Bl-2 ein Gemisch aus zwei möglichen Pentaacetaten 99 und 1oo darstellte.
Die Acetatgruppen an C-4' bzw C-4" sollten danach die höchste Reaktivität besitzen. Abspaltung beider Gruppen führt zu Bl-3, einem Tetraacetat (1o1). Die drei Acetatgruppen im Triacetat Bl-4 befinden sich am mittleren Ring.



98 R_1,R_2,R_3,R_4,R_5 = Ac
99 R_1,R_2,R_4,R_5 = Ac R_3 = H
1oo R_1, R_2,R_3,R_5 = AC R_4 = H
1o1 R_1,R_2,R_5 = Ac R_3,R_4 = H
1o2 R_1,R_2 = Ac R_3,R_4,R_5 = H

Der Einfachheit halber sollen die NMR-Daten der farblosen Substanzen in einer Tabelle aufgeführt werden.
Die Zuordnung der Signale wird durch den Vergleich mit Atromentinleucoperacetat (1o3) und Thelephorsäureleuco-

acetat-(97)Spektren erleichtert.



103

Tab. 8 NMR-Spektren (in Aceton-d_6)

		H-3'	H-6'	H-2"6"	H-3"5"	CH_3
Bl-1	98	7.48	7.57	7.33(d)	7.14(d)	2,45(3H) 2,33-2,39(9H) 2,16(3H) 1,98(3H)
Bl-2	99	7.5o	7.57	7.35(d)	7.16(d)	2,5o(3H) 2,15(3H) 2,33-2,4o (6H) 2,oo (3H)
	1oo	7.17	7.53	7.22(d)	6.88(d)	
Bl-3	1o1	7.o8	7.44	7.17(d)	6.82(d)	2,44(3H) 2,36(3H) 2,16(3H) 2,oo(3H)
Bl-4	1o2	7.11	7.26	7.11(d)	6.88(d)	2,48(3H) 2,14(3H) 2,o6(3H)

	H-3'	H-6'	H-3"	H-6"	CH_3
97	7.61	7.68	7.61	7.68	2.51(6H) 2.36(12H)

	H-2'6'	H-3'5'	H-2"6"	H-3"5"	CH_3
103	7.35(d)	7.13(d)	7.35(d)	7.13(d)	2.31(6H) 1.95(12H)

Analog zur Acetylierung des Gemischs der vier Substanzen zu einem gemeinsamen Peracetat sollte auch die Verseifung der Acetate zu einem einheitlichen Produkt, dem Cycloleucomelon, führen. Versetzte man die methanolische Lösung des Rohgemischs mit K_2CO_3, so verfärbte sie sich augenblicklich türkisblau bis grün. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisch brachte jedoch nicht das erwartete Ergebnis, es entstanden neben grünen und grünblauen Verbindungen nur Spuren von Cycloleucomelon.

2.5. Aufarbeitung des methanolischen Extrakts von B.LEUCOMELAS

Die in Methanol/HCl eingelegten Pilze wurden abfiltriert und gut nachgewaschen. Die intensiv blaugrüne Farblösung wurde eingeengt und mit Essigester erschöpfend extrahiert. Der graubraune Rohextrakt bestand im wesentlichen aus drei Hauptprodukten, die in der Reihenfolge ihrer R_F-Werte als Bl-Farblos, Bl-Blau und Bl-Braun bezeichnet wurden.

Die drei Hauptprodukte wurden an Sephadex LH2o mit Methanol vorgetrennt und mit Methanol/Wasser 4:1 rechromatographiert.

2.6. Strukturaufklärung der Pigmente

Bl-Braun konnte aus Essigester/Petrolether als braunes, amorphes Pulver mit einem Schmelzpunkt >35o °C ausgefällt werden.

Durch sein MS mit dem Molpeak m/e 338 $\left[C_{18}H_{10}O_7\right]$ und sein NMR-Spektrum mit dem typischen Aromatenbereich (zwei Singuletts, ein AA'BB'-Quartett, $\underline{J}$ = 8 Hz) ließ sich Bl-Braun eindeutig als Cycloleucomelon (83) identifizieren.

Bl-Farblos konnte ebenfalls sehr schnell in seiner Struktur aufgeklärt werden: Nach DC-Vergleich und spektroskopischen Daten erwies es sich als identisch mit Cycloleucomelon-leucotriacetat, der Substanz Bl-4 aus frischem B.LEUCOMELAS.

Interessanter schien Bl-Blau zu sein, das durch seine Intensität die ungewöhnliche Färbung des Rohextrakts bestimmte.
Es wurde durch mehrfache Chromatographie an Sephadex LH2o mit Methanol gereinigt; eine farblose Substanz mit gleichem R_F-Wert ließ sich jedoch nur unvollständig abtrennen.

Bl-Blau zeigt in Methanol eine tiefe, tintenblaue Farbe, in Essigester ist es rotviolett. Diese Farben und das UV-Spektrum mit dem sehr langwelligen Absorptionsmaximum von λ_{max} = 56o nm lassen auf eine o-Chinon-Struktur für Bl-Blau schließen.

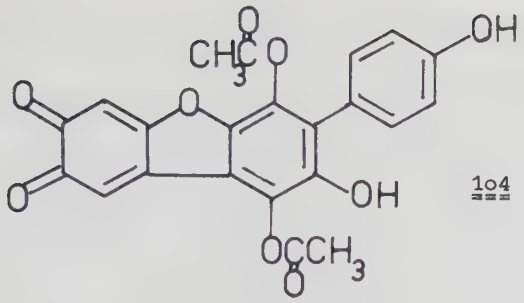
Das Massenspektrum mit M^+ $\underline{m/e}$ 422/424, zwei Ketenabspaltungen zum Basepeak $\underline{m/e}$ 338/34o und einer CO-Abspaltung zu m/e 31o ist identisch mit dem MS für Cycloleucomelondiacetat aus A.DISCOLOR.

Die naheliegende Vermutung, daß der mittlere Ring ein 1,2-Benzochinon statt des 1,4-Benochinons darstellt, muß nach dem NMR-Spektrum verworfen werden. Vergleicht man nämlich die NMR-Spektren von Cycloleucomelon (83), Cycloleucomelon-diacetat (82) und Bl-Blau, so erkennt man, daß die Aromatensignale von Bl-Blau gegenüber Cycloleucomelon zu höherem Feld verschoben sind. Die Signale des Diacetats zeigen aber aufgrund der Acetatgruppeneinflüße eine deutliche Tieffeldverschiebung. Die Acetatgruppen in Bl-Blau sollten sich deshalb am mittleren Ring, wahrscheinlich an C-1 und C-4, befinden.

Tab. 9 NMR-Vergleich von Bl-Blau mit Cycloleucomelonderivaten (in Aceton- d_6)

	H-3'	H-6'	H-2"6"	H-3"5"	CH_3
82	7.2o	7.43	7.34(d)	6.86(d)	
83	7.37	7.77	7.25(d)	6.95(d)	2.23 2.33
Bl-Blau	7.o8	7.23	7.16(d)	6.87(d)	2.oo 2.4o

Für Bl-Blau wird darauf hin als mögliche Struktur die eines 3-(4-Hydroxyphenyl)-1,4-diacetoxydibenzofuran-7,8-dions (104) vorgeschlagen.



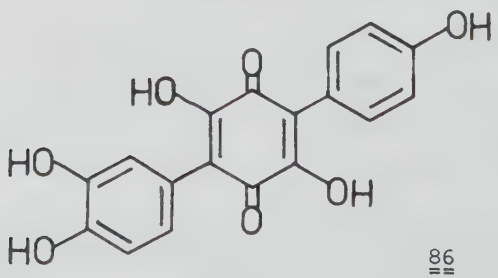
104

Die diesem o-Chinon zugrundeliegende Leucoform, das Cycloleucomelon-leucodiacetat, konnte nicht nachgewiesen werden.
In einem Handversuch gelang es, auch 1,2,4-Triacetoxy-leucocycloleucomelon (Bl-4) in eine blaue Verbindung zu überführen, die sich von Bl-Blau durch eine zusätzliche Acetylgruppe unterscheiden sollte.

Auf die Isolierung weiterer Nebenpigmente aus B.LEUCOMELAS wurde verzichtet, zumal man wohl mit Sicherheit annehmen kann, daß alle blauen und braunen Pigmente Artefakte des aus frischem B.LEUCOMELAS isoliertem Cycloleucomelon-leucoperacetats sind.
In dieses Acetat ließ sich der grünblaue Rohextrakt durch reduzierende Acetylierung mit Zinkstaub, Acetanhydrid und Natriumacetat glatt überführen.

2.7. Vergleich von Leucomelon und Cycloleucomelon

Untersuchungen zu Farbstoffen aus BOLETOPSIS LEUCOMELAS wurden bereits 1942 von Akagi[57] veröffentlicht.
Akagi beschreibt die Isolierung und die Eigenschaften eines braunen und eines weißen Farbstoffs, Leucomelon bzw. Protoleucomelon genannt.
Die Struktur des Leucomelons wurde mit Hilfe von Abbaureaktionen, Derivatisierung und vor allem mit Hilfe der CH-Analyse aufgeklärt.
Demnach sollte Leucomelon die Summenformel $C_{18}H_{12}O_7$ besitzen. Zinkstaubdestillation und alkalische Oxidation führten zu den Abbauprodukten p-Terphenyl, p-Hydroxybenzoesäure und Protocatechusäure, typischen Abbauprodukten der Terphenylchinone.
Nach reduzierender Acetylierung zu einem 'Penta'acetat wurde für'Leucomelon' die Struktur 86 vorgeschlagen.



86

Protoleucomelon sollte das Leucoperacetat dieser Verbindung sein.

Wie nach der neuen Aufarbeitung von B.LEUCOMELAS zu erwarten ist, stimmen die von Akagi ermittelten Schmelzpunkte mit denen der Cycloleucomelonderivate überein.

Cycloleucomelon und das durch die Synthese von Lohrisch[59] zugängliche Leucomelon sollen nun in ihren Eigenschaften und spektroskopischen Daten gegenübergestellt werden.

Tab. 1o Schmelzpunkte

Leucomelon(86)	Peracetat	Leucoperacetat
32o°C	191-192°C	218°C
Cycloleucomelon (83)		
a) nach Akagi		
32o°C	226-227°C	2o4-2o5°C
b) eigene Messung		
35o °C	223-224°C	2o4-2o5°C

Tab. 11 ^{1}H-NMR-Daten (86 in Aceton/DMSO-d_6, 83 Aceton-d_6)

	H-2'6'	H-3'5'	H-2"	H-5"6"
86	7.36(d)	6.86(d)	7.o3-6.96 (m)	6.87-6.79 (m)

	H-2'6'	H-3'5'	H-3"	H-6"
83	7.34(d)	6.86(d)	7.2o	7.43

Die ^{13}C-NMR-Daten von Cycloleucomelon (83) und Cycloleucomelonleucoperacetat (84) wurden mit den von Lohrisch[59] ermittelten Daten für Leucomelon (86) verglichen und dementsprechend zugeordnet.

Tab. 12: ^{13}C-NMR-Daten (in DMSO-d_6)

	86	83	84
C-1	169.o	176.4	142.8
C-2	169.o	153.5	139.8
C-3	116.5	117.1	128.3
C-4	169.o	179.5	142.8
C-5	169.o	151.4	15o.6
C-6	113.9	118.5	118.9
C-1'	121.9	121.2	134.o
C-2'	132.7	132.1	13o.5
C-3'	115.4	114.3	121.9
C-4'	157.9	156.8	146.3
C-5'	115.4	114.3	121.9
C-6'	132.7	132.1	13o.5
C-1"	122.3	118.5	118.4
C-2"	115.7	1o5.o	116.4
C-3"	145.4	146.1	136.2
C-4"	146.o	148.5	142.7
C-5"	119.o	98.8	1o8.1
C-6"	122.9	15o.4	153.o

2.8. Diskussion der Ergebnisse

Leucomelon ist relativ instabil: die oxidative Ringschlußreaktion zum Dibenzofuransystem des Cycloleucomelons läuft beim Stehenlassen der Lösung von selbst ab. Durch Zusatz von Oxidationsmitteln wie Ag_2CO_3/Celite oder Ag_2O wird die Reaktion stark beschleunigt.
Daher ist Leucomelon zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit der biosynthetische Vorläufer der Pigmente aus B.LEUCOMELAS und aus ANTHRACOPHYLLUM-Arten. Seine Isolierung als Naturprodukt ist jedoch sehr unwahrscheinlich.
Auch das 'hypothetische' Terphenylchinon Variegatin konnte bisher nicht als Naturstoff nachgewiesen werden. Das aus SUILLUS GREVILLII und aus ANTHRACOPHYLLUM 73/2o8 isolierte Cyclovariegatin stellt wohl ein etwas stabileres und damit faßbares Zwischenprodukt dar, das aber auch bereits beim Stehen in Lösung zu Thelephorsäure weiterreagiert.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Pigmente einiger Phlegmacien-Arten isoliert und in ihren Strukturen als dimere Tetrahydroanthracenderivate aufgeklärt.

C.ELEGANTIOR enthält neben Flavomannin-6,6',8'-trimethylether (3) ein fluoreszierendes Pigment, Cortinarin (43), in dem die Molekülhälften über eine Etherbrücke verknüpft sind. Die aufgrund der behinderten Rotation um die Aryl-O-Bindung auftretende Stereoisomerie wird diskutiert.

Das Hauptpigment eines von uns nicht näher bestimmten Pilzes, der im Habitus C.ELEGANTIOR sehr ähnlich ist,wurde als Phlegmacin-8-methylether (1o) erkannt.

In C.ATROVIRENS wurde mit dem Monomeren Atrochryson (19) die Schlüsselverbindung der Biosynthese nachgewiesen.

Die dimeren Pigmente Atrovirin (48) und 4,4'-Dioxoatrovirin (52) zeigen eine neuartige 5,5'-Verknüpfung. Außerdem wurden 4-Hydroxyatrochryson (5o) und Skyrin (49) isoliert.

Das aus C.AUREOTURBINATUS gewonnene Phlegmacin (9) wird in seiner Stereochemie diskutiert.

C.RUFOOLIVACEUS enthält neben dem farblosen Acylnaphthalin Torachrysonmethylether (59) zwei rote Farbstoffe, Rufoolivacin (61) und 2-Hydroxyrufoolivacin (62), für die Diphenochinonstrukturen vorgeschlagen werden.

Die Stereochemie und die mögliche Biosynthese dieser Verbindungen werden erörtert.

Die CD- und ORD-Kurven der Phlegmacien-Pigmente werden diskutiert.
Die ^{13}C-NMR-Spektren der dimeren Tetrahydroanthracenderivate und von einigen Pilzanthrachinone werden vorgestellt.

Die Pigmente aus ANTHRACOPHYLLUM-Arten wurden isoliert und als Terphenylchinonderivate erkannt.
ANTHRACOPHYLLUM DISCOLOR enthält ein Diacetat von Cycloleucomelon (83), A.73/208 außerdem Acetate des Cyclovariegatins (94).
Das Hauptpigment aus BOLETOPSIS LEUCOMELAS konnte als Leucoacetat des Cycloleucomelons identifiziert werden.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Die Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

UV: Beckman Spectrophotometer Modell 25
Cary 17

IR: Pye Unicam SP 1100 Infrared Spectrometer, angegeben werden die Wellenzahlen (cm^{-1})

^{1}H-NMR: Bruker WH 90, angegeben werden δ-Werte in ppm. TMS als innerer Standard (δ_{TMS} = 0.00)
Multiplizitäten: s=Singulett, d=Dublett, m=Multiplett

^{13}C-NMR: Bruker WP 80 und WH 90

MS: MS 30 und MS 9 (AEI), Probenaufgabe über Direkteinlaß, gemessen wurde bei 70eV Ionisierungsenergie.

CD: Circulardichrographe Jouan-Roussel III

Optische Drehwerte: Polarimeter 241 (Perkin-Elmer)

Die Schmelzpunkte wurden nicht korrigiert.

Chromatographie

Präparative Dünnschichtplatten: Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt, Nr.7747)

Analytische Dünnschichtchromatographie: DC-Alufolien Kieselgel 60, F_{254} (Merck, Darmstadt Nr.5553)
HPTLC-Platten Kieselgel 60, F_{254} (Merck, Darmstadt Nr.5628)

Laufmittel: Benzol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10/5/3.

Säulenchromatographie: MN-Polyamid SC 6-AC (Macherey und Nagel, Düren), Sephadex LH2o (Pharmacia,Uppsala, Schweden) und MN-Kieselgel 6o (Macherey und Nagel, Düren).

Hochdruckflüssigkeitschromatographie: μ-Bondapak C_{18}, Waters, Gerät: Waters mit UV-Detektor Schoeffel.

An dieser Stelle möchte ich Frau R.Leven und Herrn C.Schmidt für die ausgezeichnete Durchführung der NMR-Spektren danken.
Für die Aufnahme der CD-Spektren danke ich Herrn E.Kirmeyer.

1. CORTINARIUS ELEGANTIOR

1.1 C.ELEGANTIOR-typische Form

1.1.1 Aufarbeitung der Pilze

Die im Herbst 1978 in Nassereith gesammelten und in MeOH/HCl/Ascorbinsäure eingelegten Pilze (Trockengewicht nach Extraktion 125 g) wurden von der Farblösung abfiltriert, im Mixer zerkleinert und erneut mit MeOH/HCl/Ascorbinsäure bedeckt zwei Tage bei Raumtemperatur stehengelassen.
Die vereinigten Farblösungen wurden eingeengt und erschöpfend mit Essigester extrahiert. Der orange-gelbe Extrakt (5 g) wurde zum Entfetten mit Petrolether 4o-6o °C behandelt.

1.1.2 Isolierung der Anthrachinoncarbonsäuren

Der Rohextrakt wurde mit Phosphatpuffer pH =7 (2.45 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 2.o g $(NH_4)_2SO_4$ in 1oo g H_2O) aufgenommen. Die intensiv rote Lösung wurde mit Essigester ausgeschüttelt: die organische Phase enthielt die Hauptpigmente (s. 1.1.3.)
Die wäßrige Phase wurde angesäuert (Farbumschlag nach gelb) und mit Essigester extrahiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels und weitestgehender Abtrennung der Fumarsäure erhielt man das Säurenrohgemisch (12o mg), das über präparative DC (Kieselgel, saures Laufmittel) aufgetrennt wurde. Dabei entwickelten sich vier intensiv gelbe Zonen, nach fallendem R_F-Wert A_1,A_2,A_3 und A_4 genannt.

Endocrocin (A_1) 18

hellgelbe Kristalle Ausbeute 12 mg

(Eisessig) Smp. 318 C (Zers.)

$C_{16}H_{10}O_7$ (314)

Dermolutein (A_2) 35

orange-braune Nadeln Ausbeute: 22 mg

(EtOH/H_2O) Smp. 3oo C (Zers.)

$C_{17}H_{12}O_7$ (328)

Cortinarsäure (A_3) 33

hellrote Mikrokristalle Ausbeute: 25 mg

Smp. 27o C (Zers.)

$C_{16}H_8O_9$ (344)

8-Methylcortinarsäure (A_4) 37

Gelbe Mikrokristalle Ausbeute: 2o mg

Smp. 25o C (Zers.)

$C_{17}H_{1o}O_9$ (358)

1.1.3 Isolierung der Hauptpigmente

Der gelbe Rohextrakt (2.3 g) wurde über eine Säule(8ox3o) mit acetyliertem Polyamid chromatographiert.

Mit PE und PE/Toluol-Gemischen wurde ein schwach gelber

Vorlauf eluiert. Mit Toluol und Toluol/Essigester 3:2 folgten zwei Zonen A und B. Mit Toluol/Essigester 2:3 wurde eine blaßgelbe, bei λ = 366nm intensiv hellblau fluoreszierende Substanz C gewonnen,und reiner Essigester eluierte das grüngelbe Pigment D.

Die Substanz C wurde an acetyliertem Polyamid rechromatographiert (Toluol/Essigester 2:1) und aus Essigester/PE auskristallisiert.
Nach DC und spektroskopischen Untersuchungen bestand die Substanz C aus zwei dicht beieinander liegenden stereoisomeren Formen. Die chromatographische Trennung der Isomeren war nicht möglich.

Cortinarin C_1 43 (C)

blaßgelbe Mikrokristalle Ausbeute 12o mg

Smp. 192 °C (Zers.)

$C_{33}H_{32}O_{1o}$ (588)

$[\alpha]_{546}^{25}$ = -11° (c = o.o36 in Methanol)

MS : m/e 588 (3o%, M^+), 57o (15%), 552 (15%), 318 (24%), 298 (38%), 284 (8o%), 27o (1oo%).

IR (KBr) : 35oo (m), 29oo (w), 163o (ss), 1585 (sh), 147o (s), 141o (sh), 1385 cm^{-1}.

UV (in Methanol) : λ_{max} 385 (ε 23ooo), 338 sh (1oooo) 315 (13ooo), 3o2 sh (11ooo), 27o (86ooo), 232 (32ooo).

CD (in Methanol): λ_{max} 4o3,5 ($\Delta\varepsilon$-2.41), 365 (+2.19) 327 (+2.63), 313 (+2.85), 29o (+1.92) 245 (-1o.o9), 235 (-11.24), 215 (+9.86).

Oxidation von Cortinarin

a.) Eine Spatelspitze Cortinarin wurde mit einigen Millilitern 1n NaOH versetzt und kurze Zeit erhitzt (3o min, 6o°C). Die rotgefärbte Reaktionslösung wurde vorsichtig angesäuert und mit Essigester ausgeschüttelt.
Nach DC hatte sich Cortinarin vollständig umgesetzt zu zwei gelben Substanzen, die nach Vergleich mit authentischen Proben als Physcion (38) und Physcion-8-methylether (39) identifiziert wurden.

b.) Eine Spatelspitze Cortinarin wurde mit einigen Millilitern 1n NaOH versetzt und bei Raumtemperatur stehengelassen. Den Verlauf der Reaktion kontrollierte man dünnschichtchromatographisch. Nach 45 min konnte eine quantitative Umsetzung zu Physcion und Physcion-8-methylether festgestellt werden. Die gelben Oxidationsprodukte wurden wie üblich isoliert und über präparative Dünnschichtplatten getrennt.

Physcion 38

$C_{16}H_{12}O_5$ (284) massenspektroskopisch

Physcion-8-methylether 39

$C_{17}H_{14}O_5$ (298) massenspektroskopisch

Das grüngelbe Pigment D wurde über acetyliertem Polyamid mit Toluol/Essigester-Gemischen rechromatographiert. Über eine kleine Säule mit Sephadex LH2o wurde mit Methanol nachgereinigt und aus Essigester/PE auskristallisiert.

Flavomannin-6,6',8'-trimethylether B 3 (D)

hellgrüngelbes feinkristallines Pulver, Smp 198°C (sintern ab 192°C) Ausbeute: 95 mg

$C_{33}H_{32}O_{1o}$ (588)

$[\alpha]_{546}^{25}$ = + 51o° (c = o.o1 in Methanol)

MS : m/e 588(M^+, 5%), 57o (49%), 552 (35%), 521 (35%), 52o (25%), 284 (51%), 27o (1oo%),

IR (KBr): 347o (m), 2999 (w), 1635 (ss), 1575 (sh), 1515 (w), 1465 (s), 1415 (sh), 1385 (s) cm^{-1}.

UV (in Methanol) : λ_{max} 395 (ε 2oooo), 33o sh (14ooo),
317.5 (17ooo), 3o7.5 sh (14ooo),
277.5 (85ooo), 232 (34ooo).

CD (in Methanol) : λ_{max} 4oo($\Delta\varepsilon$+1o.12), 281.5 (+127.4)
262.5 (-141.66), 229 (-14.88).

Die Substanzen A und B wurden an acetyliertem Polyamid mit Toluol/Essigester-Gemischen rechromatographiert und über Sephadex LH 2o mit Methanol nachgereinigt.

Anhydroflavomannin-9,1o-chinon-6,6',8'-trimethylether 41 (A)

orangefarbenes feinkristallines Pulver, Smp. 2o8-21o°C

Ausbeute 23 mg

$C_{33}H_{28}O_{1o}$ (584)

$[\alpha]_{546}^{25}$ = + 486° (c = o.o1 in Methanol)

IR (KBr) : 352o (breit), 298o (w). 172o (sh), 1675 (sh), 163o (ss), 16o5 (sh), 157o (m), 148o, 143o (sh) 14o5 (sh).

MS : m/e 584 (M^+, 51%), 566 (15), 553 (25), 535 (18) 523 (22), 284 (1oo).

UV (in Acetonitril) : λ_{max} 435 (ε 16ooo), 39o (17ooo), 33o sh (1oooo), 312 sh (19ooo), 275 (74ooo) 218 (47ooo).

CD (in Acetonitril) : λ_{max} 43o ($\Delta\varepsilon$+5.67), 365 (+2.26), 31o (-7.18), 283 (+66.48), 268.5 (-39.3), 226 (-13.6).

Anhydroflavomannin-9',1o'-chinon-6,6',8'-trimethylether 42 (B)

Ausbeute Spuren

$C_{33}H_{28}O_{1o}$ (584)

1.2. C.ELEGANTIOR -abweichende Form

1.2.1. Aufarbeitung der Pilze

Zur Verfügung standen in Methanol/HCl/Ascorbinsäure eingelegte Pilze, die im Herbst 1978 in Nassereith/Tirol gesammelt wurden und ohne lange Lagerzeit aufgearbeitet werden konnten.
Dazu wurden sie von der intensiv gelben Farblösung abfiltriert, im Mixer zerkleinert und erneut mit Methanol/HCl/Ascorbinsäure bedeckt bei Raumtemperatur stehengelassen. Diese Extraktion wurde zweimal wiederholt.
Die vereinigten Extrakte wurden eingeengt und erschöpfend mit Essigester ausgeschüttelt. Das Rohgemisch wurde zum Entfetten mehrmals mit Petrolether 4o-6o °C unter leichtem Erwärmen digeriert.
Der so entfettete Extrakt (2.5 g) wurde über eine Säule (8ox3o) an acetyliertem Polyamid chromatographiert.
Das Trockengewicht der Pilze nach der Extraktion betrug 95 g.

1.2.2. Isolierung der Pigmente

Die Chromatographie lieferte mit PE und PE/Toluol- Gemischen einen schwach gelben, öligen Vorlauf. Toluol/Essigester 1:1 eluierte ein gelbes Pigment (A) und reiner Essigester das grüngelbe Hauptpigment (B).

Die beiden Pigmente wurden an acetyliertem Polyamid mit Toluol/Essigester-Gemischen rechromatographiert und aus Essigester/PE auskristallisiert.

Anhydrophlegmacin-9,1o-chinon-8'-methylether 45 (A)

gelbes mikrokristallines Pulver Ausbeute 2o mg

Smp. 162 C°(Zers.)

$C_{33}H_{28}O_{1o}$ (584)

MS : m/e 584 (31%), 567 (4o), 566 (1oo), 548 (14), 285 (1o), 27o (28).

Phlegmacin-8'-methylether B_2 1o (B)

hellgrüngelbe Mikrokristalle Ausbeute 8o mg

Smp. 16o°C (Zers.,Sintern ab 146°C)

$C_{33}H_{32}O_{1o}$ (588)

$[\alpha]_{546}^{25}$ = - 122° (c = o.o1 in $CHCl_3$)

MS : m/e 588 (M^+, 2%), 57o (25),552 (22), 284 (49), 27o (1oo).

IR (KBr) : 349o (breit), 299o, 1625 (ss), 1585(sh), 1515 (w), 147o (m), 142o (s) cm^{-1}.

UV (in Methanol) : λ_{max} 392 (ε 17ooo), 329 sh (13ooo) 317 (15ooo), 277 (69ooo), 232 (3oooo)

CD (in Methanol): λ_{max} 4oo ($\Delta\varepsilon$ +6.11), 315 (+6.11), 281.5 (+75.84), 262 (-84.4o), 23o (-11.o1).

2. CORTINARIUS ATROVIRENS

2.1. Aufarbeitung der Pilze

Zur Verfügung standen gefriergetrocknete Pilze (6o g, gesammelt im Sept. 1975) und 4 im Okt. 1978 in Weilheim bei Tübingen gefundene Exemplare, die sofort aufgearbeitet werden konnten (Frischgewicht 58 g).
Die gefriergetrockneten Pilze wurden zerkleinert und zum Entfetten mit PE 4o-6o °C bedeckt 3 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen.
Die abfiltrierten Pilze wurden zunächst mit Aceton (6oo ml, 2 Tage, Raumtemperatur) und anschließend mit Methanol/HCl/ Ascorbinsäure (3x5oo ml, 2 Tage, Raumtemperatur) erschöpfend extrahiert. Der Methanolextrakt wurde nach dem Eingengen mit Wasser aufgenommen und mit Essigester mehrmals ausgeschüttelt.
Die Rohextrakte konnten zusammengefaßt werden und ergaben ein braun-grünes Rohprodukt von 3.1 g.
Die frischen Pilze wurden ohne vorhergehendes Entfetten wie oben beschrieben mit Aceton (2oo ml) und anschließend mit Methanol/HCl/Ascorbinsäure (2x2oo ml) extrahiert. Auch hier wurden die Rohextrakte zusammengefaßt zu einem grau-grünen Rohextrakt von 97o mg.

2.2. Isolierung der Pigmente

Zur Auftrennung des Rohgemischs wurden die Extrakte in Portionen zu ungefähr 1 g auf eine Säule (8ox3o) mit

Sephadex LH 2o aufgetragen und mit Methanol chromatographiert.
Dabei trennten sich nacheinander drei grün-gelbe Zonen ab, die als Fraktionen 1, 2 und 3 aufgefangen wurden. Danach wurde eine orange-rote Zone, Fraktion 4 eluiert.
Bei der Chromatographie des Rohextrakts der gefriergetrockneten Pilze erhielt man noch eine gelbe Fraktion 5 und eine rote Fraktion 6 (Artefakte).

Fraktion 1 wurde an acetyliertem Polyamid rechromatographiert. Dabei erhielt man mit Toluol/Essigester 9:1 das Pigment Grün 4, Atrochryson (19). Mit Aceton und Methanol erhielt man eine weitere hellgrüne Zone, die mit Fraktion 2 vereinigt wurde.
Atrochryson konnte aus Toluol/Essigester auskristallisiert werden.

Atrochryson 19 (Grün 4)

hellgrüne Mikrokristalle Ausbeute 8 mg

Smp. 22o °C (Zers.)

$C_{15}H_{14}O_5$ (274)

$[\alpha]_{546}^{25} = -7°$ (c = o.oo1 in Methanol)

MS : m/e 274 (M^+, 1oo%), 265 (91), 241 (2o), 216 (49).

IR (KBr) : 349o (breit), 33oo (breit), 294o (w), 1648 (ss) 162o (ss), 1465 (m), 139o (s).

UV (in Methanol) : λ_{max} 397.5 (ε 5ooo), 335sh (2ooo), 321 sh (24oo), 272 (16ooo), 226 (9ooo).

CD (in Methanol) : λ_{max} 4o5 (Δε+o.o76), 331 (-o.15), 282.5 (+1.o1), 261.5 (-o.91).

Alkalische Oxidation zu Emodin 2o

o.4 mg Atrochryson wurden mit 1.5 ml 1 n NaOH versetzt und 3h auf 6o°C erhitzt.
Nach Ansäuern und Ausschütteln mit Essigester erhielt man das fast reine Oxidationsprodukt, das nach DC-Vergleich mit authentischem Material und MS-Spektrum mit Emodin (2o) identifiziert wurde.

Emodin 2o

$C_{15}H_{1o}O_5$ (27o) Ausbeute Spuren
(massenspektrometrisch)

Fraktion 2 wurde über eine lange Säule an acetyliertem Polyamid rechromatographiert.
Mit Aceton erhielt man eine grüngelbe Zone, Atrovirin (Grün 3) und Methanol eluierte eine weitere gelbe Zone, die ein chromatographisch nicht weiter trennbares Gemisch aus Atrovirin und 4-Hydroxyatrochryson (Grün 2) darstellte.
Atrovirin wurde aus Essigester/Petrolether als mikrokristallines Pulver ausgefällt.

Atrovirin B_1 48 (Grün 3)

hellgrün-gelbe Mikrokristalle Ausbeute 2o mg

Smp. 19o °C (Zers.)

$C_{3o}H_{26}O_{1o}$ (546)

$[\alpha]_{546}^{25}$ = + 365° (c = o.oo4 in Methanol)

MS : m/e 546 (M^+,12%), 528 (7.8), 51o (5.3), 274 (34.8), 256 (1oo), 241 (3o), 216 (18) 213 (9), 185 (11).

IR (KBr) : 341o (breit), 295o (w), 1635 (ss),159o (ss), 147o (w), 135o (m).

UV (in Methanol) : λ_{max} 4oo (ε 135oo), 321 sh (84oo), 285 sh (35ooo), 27o (36ooo), 227 (24ooo).

CD (in Methanol) : λ_{max} 42o ($\Delta\varepsilon$ +2.41), 337.5 (-5.84), 324 sh (-3.21), 3o7.5 sh (+4.82), 282.5 (+5o.33), 262 (-47.11), 221 (+5.o9).

Alkalische Oxidation zu Skyrin 49

Eine Spatelspitze wurde mit 1 ml 1 n NaOH 3h auf 6o °C (Wasserbad) erhitzt. Anschließend wurde vorsichtig angesäuert und mit Essigester ausgeschüttelt. Man erhielt ein orangegelbes Oxidationsprodukt, das nach DC-Vergleich und der charakteristischen Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 mit Skyrin (49) identifiziert wurde. Das Produkt wurde

isoliert und über präparative DC gereinigt.

Skyrin 49

$C_{30}H_{18}O_{10}$ (538) Ausbeute Spuren
(massenspektrometrisch)

4-Hydroxyatrochryson 50 (Grün 2)

Ausbeute Spuren

$C_{15}H_{14}O_6$ (290)

MS : m/e 290 (M^+, 100%), 272 (65), 257 (90), 232 (25).

Alkalische Oxidation zu Catenarin 51

Eine Spatelspitze des Gemischs von Atrovirin und 4-Hydroxyatrochryson wurde mit 1 ml 1 n NaOH versetzt und auf dem Wasserbad (60°C) erhitzt (3h).
Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man ein Gemisch aus zwei Substanzen, die mit Hilfe eines DC-Vergleichs mit authentischen Proben als Skyrin und Catenarin identifiziert wurden.

Catenarin 51

$C_{15}H_{10}O_6$ (286) Ausbeute Spuren
(massenspektrometrisch).

Die Fraktion 3 wurde an einer kleinen Säule mit Sephadex LH 2o mit Methanol rechromatographiert.
Nach Auskristallisieren aus Essigester/Petrolether erhielt man das Pigment Grün 1, 4,4-Dioxoatrovirin als hellolivgrünes, feinkristallines Pulver.

4,4'-Dioxoatrovirin A_1 52 (Grün 1)

helloliv-grünes Pulver Ausbeute 35 mg

Smp 26o °C (Zers.)

$C_{3o}H_{22}O_{12}$ (574)

$[\alpha]_{546}^{25} = -465°$ (c = o.ooo1 in Methanol).

MS : m/e 538 (1oo%, $M^+ - 2\ H_2O$), 52o (36)

IR (KBr) : 342o (breit), 297o (m), 17oo (m), 162o (ss) 157o (sh), 1515 (sh), 146o (s), 1415 cm^{-1}.

UV (in Methanol) : λ_{max} 425 (ε 2550o), 4o5 sh (22ooo), 282 (5oooo),24o (31ooo).

CD (in Methanol) : λ_{max} 43o ($\Delta\varepsilon$ -19.o6), 39o (+4.67), 293.5 (-3o.58), 271 (+23.38), 239.5 (+13.69).

Alkalische Oxidation zu Dicatenarin 53 und reduktive Spaltung zu Catenarin.

In einem Handversuch wurde eine Spatelspitze 4,4'-Dioxoatrovirin mit 2 ml 1 n NaOH erhitzt. Die Lösung verfärbte

sich nach kurzer Zeit tiefblau.
Nach Ansäuern (Farbumschlag nach rot-violett) erhielt man ein verunreinigtes rotviolettes Produkt, das ohne Reinigung und Identifizierung weiter umgesetzt wurde.
Die Substanz wurde in Na_2CO_3-Lösung gelöst und bei 6o°C (Wasserbad) 3o min. erhitzt.
Dann wurde tropfenweise eine Lösung von 3o mg $Na_2S_2O_4$ in o.5ml H_2O zugesetzt. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch 1o min. gerührt.
Unter Kühlung wurde vorsichtig mit 2 n HCl neutralisiert und die gelbe Lösung mit Essigester ausgeschüttelt.
Das DC des Reaktionsgemischs zeigte neben Verunreinigungen einen roten Substanzfleck, der nach DC-Vergleich mit authentischer Probe, Fluoreszenzerscheinung (λ = 366 nm) und Anfärbereaktion mit Catenarin identifiziert wurde.

Das orange-gelbe Pigment der Fraktion 4 wurde über präparative DC (Kieselgel, 'saures Laufmittel') gereinigt. Man erhielt nach üblicher Aufarbeitung und Kristallisation aus Essigester/Petrolether eine feinkristalline Substanz, die aufgrund ihrer typischen grünen Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 als Skyrin identifiziert wurde.

Skyrin 49

orange-gelbes mikrokristallines Pulver, Smp. 3oo°C — Ausbeute 15 mg

$C_{3o}H_{18}O_{1o}$ (538)

MS : m/e 538 (M^+, 5%), 52o (1oo), 412, 394, 269.

IR (KBr) : 344o (breit), 294o (m), 287o (w), 1685 (sh), 1635 (ss), 161o (s), 15oo(w), 14oo (s) cm^{-1}.

UV (in Methanol): λ_{max} 458 (ε 19ooo), 297 (24ooo), 258 (37ooo) 222 (43ooo).

CD (in Methanol) : λ_{max} 485 ($\Delta\varepsilon$+18.65), 475 sh (+17.39), 43o (-12.64), 3o5 sh (-8.55), 292.5 (-11.38), 26o.5 (+39.2o), 246 (-9.48) 22o (-8.22).

Die gelbe Fraktion 5 wurde über eine Säule mit Sephadex LH 2o rechromatographiert. Dabei eluierte Methanol zunächst ein gelbes Pigment Gelb 1 und anschließend ein weiteres Pigment Gelb 2.

Anhydro-4,4'-dioxoatrovirin-9,1o-chinon 55

gelbe Mikrokristalle — Ausbeute 3 mg

$C_{3o}H_{2o}O_{12}$ (572)

^{1}H-NMR (in Aceton-d_6) s.S. 65

Anhydroatrovirin-9,1o-chinon 56

gelbe Mikrokristalle Ausbeute Spuren

$C_{3o}H_{22}O_{1o}$ (542)

^{1}H-NMR (in Aceton-d_6) s.S. 66

Die Fraktion 6 wurde über präparative DC (Kieselgel, 'saures Laufmittel') getrennt. Dabei entwickelten sich vier intensiv rote Substanzen, die wie üblich aufgearbeitet wurden. Die Substanzmengen reichten jedoch für eine Identifikation der Pigmente nicht aus.

3. CORTINARIUS AUREOTURBINATUS

3.1. Aufarbeitung der Pilze

Die in Methanol/HCl/Ascorbinsäure aufbewahrten Pilze wurden von der Farblösung abfiltriert, zerkleinert und erneut mit Methanol/HCl/Ascorbinsäure bedeckt stehengelassen (3 Tage, Raumtemperatur). Der Extrakt wurde abzentrifugiert und eingeengt.
Die vereinigten Extrakte wurden in Wasser aufgenommen und mit Essigester erschöpfend ausgeschüttelt.
Nach Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen mit $MgSO_4$ erhielt man einen dunkelgelben Rohextrakt von 5oo mg.
Das Trockengewicht der Pilze nach der Extraktion betrug 78 g.

3.2. Isolierung der Pigmente

Das Pigmentrohgemisch wurde über eine Säule (8ox3o) an acetyliertem Polyamid chromatographiert. Mit PE und PE/Toluol-Gemischen erhielt man einen schwach gelb gefärbten, öligen Vorlauf. Toluol eluierte ein gelbes Pigment (A), Toluol/Essigester 1:3 und reiner Essigester das grüngelbe Hauptpigment (B).
Das Pigment A wurde an acetyliertem Polyamid rechromatographiert und aus Toluol auskristallisiert. Pigment B wurde über Sephadex LH 2o mit Methanol rechromatographiert und aus Essigester/PE auskristallisiert.

Phlegmacin B_1 9

hellgelbe Mikrokristalle Ausbeute 95 mg

Smp. 205-207°C (Zers.)

$C_{32}H_{30}O_{10}$ (574)

MS : m/e 574 (M^+, 10%), 556 (34), 538 (100), 292 (16), 270 (87), 269 (26)

IR ($CHCl_3$) : 3390, 1640, 1625, 1590 cm^{-1}

UV (in Methanol) : λ_{max} 395 (ε 18000), 332 sh (10000), 317.5 (13000), 277 (68000), 232 (39000).

CD (in Methanol) : λ_{max} 420 ($\Delta\varepsilon$ -1.38), 315 (+4.4), 284 (+55.83) 265 (-59.44), 226.5 (+20.55)

Anhydrophlegmacin-9,10-chinon 11

gelbes feinkristallines Pulver Ausbeute 17 mg

$C_{32}H_{26}O_{10}$ (570)

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$) = 2.50 (CH_3-3 , s), 3.90 (OCH_3-6 ,s), 7.13 (H-2, s,br), 7.61 (H-5,s), 7.71 (H-4,s,br), 12.08 (OH-1 ,s,br),12.40 (OH-8) 1.34 (CH_3-3'),2.76 (CH_2- 2'),2.85 (CH_2-4') 3.71 (OCH_3-6'),,6.08(H-5',d),6.55(H-7',d) 10.25 (OH-8'), 16,34 ppm (OH-9').

4. CORTINARIUS RUFOOLIVACEUS

4.1. Aufarbeitung der Pilze

Zur Verfügung standen Pilze, die 1975 in Keilberg gesammelt und in Methanol/HCl/Ascorbinsäure eingelegt in der Tiefkühltruhe aufbewahrt wurden.
Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man einen dunkelroten Rohextrakt (55o mg), der über acetyliertem Polyamid chromatographiert wurde.

4.2. Isolierung der Pigmente.

PE/Toluol 1:1 lieferte eine gelbe Fraktion 1, Toluol/Essigester 1:1 eluierte eine rote Fraktion 2 und Methanol eine weitere rote Fraktion 3.

Fraktion 1 wurde über präparative Dickschichtplatten (Kieselgel, 'saures Laufmittel') aufgetrennt. Dabei erhielt man zwei gelbe Pigmente Gelb 1 und Gelb 2 und eine farblose Verbindung.
Gelb 1 und Gelb 2 konnten nach DC-Vergleich mit authentischen Proben und MS-Spektren als Physcion(38) und Physcion-8-methylether (39) identifiziert werden.

Die farblose Verbindung wurde aus Ether/Petrolether umkristallisiert.

Torachryson-8-methylether 59

farblose Nadeln Ausbeute 32 mg

Smp. 98-1oo °C

$C_{15}H_{16}O_4$ (26o)

MS m/e 26o (M^+, 58%), 245 (1oo), 23o (32)

IR(KBr) : 344o (s), 295o (w), 168o (s), 1635 (ss), 159o (m), 148o (m), 1455 (m) cm^{-1}.

UV(in Methanol) : λ_{max} 338(ε 8ooo), 324 sh (7ooo), 26o (225oo) 233(4o5oo).

Fraktion 3 wurde an einer Säule mit Kieselgel rechromatographiert. Dabei eluierten Toluol/Essigester-Gemische langsam eine rote Zone, die mit Fraktion 2 vereinigt wurde. Mit Methanol erhielt man einen roten Farbstoff, der z.T. mit dem Chromatographiematerial einen Komplex bildete, so daß man dem Eluenten einige Tropfen Essigsäure zusetzen mußte. Das rote Pigment wurde über präparative DC nachgereinigt und aus $CHCl_3$/PE auskristallisiert.

Rufoolivacin 61

dunkelrotes feinkristallines Pulver, Smp. 162-164 °C Ausbeute 3o mg

$C_{32}H_{28}O_9$ (556)

MS : m/e 558 (M^+ $C_{32}H_{30}O_9$, 100%), 556 ($C_{32}H_{28}O_9$, , 41)
543 ($C_{31}H_{27}O_9$, 12.4), 528 ($C_{31}H_{28}O_8$, 84.4)
513 ($C_{29}H_{25}O_8$, 55.9), 485 ($C_{29}H_{25}O_7$, 16).

IR (KBr) : 3440 (w), 2960 (s), 1740 (w), 1660 (sh), 1625(sh)
1610 (ss), 1580 (sh), 1465 (w), 1380 (m) cm^{-1}.

UV(in Acetonitril) : λ_{max} 590 sh (ε 9000), 555 (11000),
295 (24000), 255 (34000), 225 (35000)

CD(in Acetonitril) : λ_{max} 500 ($\Delta\varepsilon$ +0.41), 440 (-0.24), 325
(+0.98), 303.5 (-0.78), 280 (+4.14),
265 (+5.29), 235 (-8.24).

Das rote Pigment aus Fraktion 2 wurde über eine Säule mit Kieselgel rechromatographiert, als Eluent diente ein Toluol/Essigester-Gemisch 1:1.
Es ließ sich aus $CHCl_3$/Petrolether ausfällen.

2-Hydroxyrufoolivacin 62

dunkelrotes feinkristallines Pulver. Smp. 202-204 °C

Ausbeute 60 mg

$C_{32}H_{30}O_{10}$ (574)

MS : m/e 574 (M^+, $C_{32}H_{30}O_{10}$, 5%), 556 ($C_{32}H_{28}O_9$, 25) 525 ($C_{31}H_{25}O_8$, 12.5), 518 ($C_{30}H_{30}O_8$, 100), 503 ($C_{29}H_{27}O_8$, 80), 488 ($C_{28}H_{24}O_8$, 6), 473 ($C_{27}H_{21}O_8$, 12), 445 ($C_{26}H_{21}O_6$, 6).

IR (KBr) : 3420 (m), 2960 (m), 1700 (w), 1665 (w), 1625 (sh) 1600 (ss), 1500 (sh), 1470 (w), 1380 (s) cm^{-1}.

UV (in Acetonitril) : λ_{max} 525(ε12000), 335 sh(15500), 306 sh (16000), 292 (16900), 257 (67000), 240 sh (55000).

2-Hydroxyrufoolivacin wurde über Hochdruckflüssigkeitschromatographie in 3 Fraktionen aufgetrennt, V1/1 , V1/2 und V1/3. Dabei bildete V1/2 laut ^{1}H-NMR-Spektrum ein 1:1 Gemisch aus V1/1 und V1/3, die als Stereoisomere von 2-Hydroxyrufoolivacin im NMR- und CD-Spektrum deutlich zu unterscheiden sind.

Chromatographiert wurde über eine kleine Säule mit μ-Bondapak, mit C_{18}-Ketten belegtes Kieselgel 'reversed phase') und mit dem Eluentengemisch Methanol/Wasser 77.5:22.5, stabilisiert mit 0.2 n Essigsäure.

Eingespritzt wurden jeweils 100 μl einer 0.1 proz. Lösung von 2-Hydroxyrufoolivacin in Methanol.

V1/1

CD (in Acetonitril) : λ_{max} 555 ($\Delta\varepsilon$ +o.15), 37o (-o.36)
335 (+1.81), 3o8 (-1.81),
27o (+3.62), 245 (-3.86).

V1/3

CD (in Acetonitril) : λ_{max} 56o ($\Delta\varepsilon$ +o.11), 367 (-o.41)
331.5 (-o.71), 31o (+o.7o)
263 (+1.98), 251.5 (-1.88).

4.3. Aufarbeitung von frischem C.RUFOOLIVACEUS

Die im Herbst 1979 bei Karlstadt/Main gesammelten Pilze wurden frisch aufgearbeitet. Dazu wurden die Fruchtkörper (Frischgewicht: 55o g) mit Methanol und etwas Ascorbinsäure bedeckt bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach 1 Tag wurde eine grünlich-braune Farblösung abfiltriert,und die Pilze wurden erneut mit Methanol/ Ascorbinsäure versetzt.
Die vereinigten Extrakte (insgesamt 4x5oo ml) wurden eingeengt und ergaben einen grau-braunen Rohextrakt, der mit Waser aufgenommen und mit Essigester erschöpfend ausgeschüttelt wurde.
Man erhielt nach Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen mit $MgSO_4$ das grau-braune Rohgemisch, das unter der UV-Lampe (λ = 366 nm) eine intensive grüne Fluoreszenz zeigte.

Zur Isolierung der Pigmente wurde der Rohextrakt (88o mg) über eine Säule (8ox3o) an acetyliertem Polyamid chromatographiert. Dabei eluierte PE und PE/Toluol einen schwach gelblichen, öligen Vorlauf. Toluol und Toluol/Essigester 1:1 lieferte eine gelbe Fraktion und reiner Essigester eine nahezu farblose, intensiv hellgrün fluoreszierende Zone.

Die gelbe Fraktion enthielt Physcion, Pyscion-8-methylether und Torachrysonmethylether (59).

Das fluoreszierende Pigment wurde über eine Säule mit Kieselgel und Essigester/Methanol-Gemischen rechromatographiert und aus Essigester/PE als blaßgrünlich-braunes Pulver ausgefällt. Die Verbindung war extrem oxidationsempfindlich: in Lösung verfärbte sie sich innerhalb kurzer Zeit rot. Das rote Oxidationsprodukt erwies sich nach DC als identisch mit Rufoolivacin.(61)

Leucorufoolivacin 78

blaßgrünliche Mikrokristalle Ausbeute 25 mg

$C_{32}H_{3o}O_9$ (558)

MS : m/e 542 (M^+ - CH_3-H, 8o%), 527 (5), 512(7) 484 (9), 284 (18), 27o (22), 26o (65), 245 (1oo), 23o (28).

IR (KBr) : 3410 (breit), 2970 (w), 1700 (sh), 1630 (ss) 1615 (sh), 1565 (w), 1460 (w), 1430 (w), 1365 (s) cm^{-1}.

UV (in Methanol) : λ_{max} 420 sh (ε 6500), 386 (13000), 365 (9000), 345 sh (9500), 238 (47000) 272 (52000)

CD (in Methanol) : λ_{max} 410 ($\Delta\varepsilon$ -0.82), 385 (-3.74), 366 (-1.95), 310 (+1.79), 275.5(-5.78) 258 (+5.78), 238 (+4.56).

5. Mycelkulturen von CORTINARIUS ORICHALCEUS

5.1. Aufarbeitung der Kulturen

Zur Verfügung standen 6o Reagenzgläser mit Schrägagarkulturen. Die Kulturen wurden mit destilliertem Wasser herausgewaschen und mit Essigester/HCl/Ascorbinsäure extrahiert (3x3ooml). Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen mit $MgSO_4$ erhielt man einen rotbraunen Rohextrakt von 36o mg.

5.2. Isolierung der Pigmente.

Der Rohextrakt wurde auf eine Säule (8ox3o) mit Kieselgel aufgetragen . Mit PE erhielt man einen öligen Vorlauf, mit PE/Toluol eine gelbe Fraktion 1, mit Toluol eine zweite gelbe Fraktion 2. Essigester eluierte eine rote Fraktion 3 und Aceton/Methanol-Gemische eine braune Zone.

Die gelben Verbindungen der Fraktionen 1 und 2 wurden nach DC-Vergleich mit authentischen Proben als Physcion und Physcion-8-methylether identifiziert.
Das rote Pigment der Fraktion 3 war nach DC-Vergleich und spektroskopischen Daten identisch mit 2-Hydroxyrufoolivacin. (s.S. 177).

Das rote Pigment aus den Kulturen zeigte auf der HPLC-Säule ('reversed phase', Methanol/Wasser 77.5:22.5) die

gleichen Retentionszeiten wie 2-Hydroxyrufoolivacin (vergl. Abb. 13, S. 91).

6. ANTHRACOPHYLLUM DISCOLOR

6.1. Aufarbeitung der Pilze

185 mg getrocknete Fruchtkörper wurden mit Petrolether 4o-6o° zum Entfetten kurze Zeit erwärmt.
Die abfiltrierten Pilze wurden mit 1o ml Aceton bedeckt stehengelassen. Nach einem Tag wurde die intensiv orangegelbe Farblösung abfiltriert,und die Pilze wurden erneut mit Aceton behandelt (insgesamt 4x1o ml). Danach wurde mit Methanol (3x1o ml) extrahiert.
Die vereinigten Extrakte ergaben einen orange-braunen Rohextrakt von ~68 mg.

6.2. Isolierung der Pigmente

Der Rohextrakt wurde auf eine Säule mit acetyliertem Polyamid aufgetragen. Mit Toluol/Essigester erhielt man eine gelbe Fraktion und mit Essigester/Methanol 9:1 eine braune Fraktion. Durch Rechromatographie an Sephadex LH 2o konnte die braune Fraktion in zwei braune Verbindungen Braun 1 und Braun 2 aufgetrennt werden.
Die gelbe Fraktion wurde an Sephadex LH 2o mit Methanol gereinigt und aus Essigester/PE ausgefällt.

Cycloleucomelon-diacetat 82

3-(4-Hydroxyphenyl)-2,7-diacetoxy-8-hydroxydibenzofuran-1,4-dion

gelbe Mikrokristalle Ausbeute 12 mg

$C_{22}H_{14}O_9$ (422)

MS : m/e 424 (M^++2, 15%), 422 (M^+, 2o), 382 (3o), 38o (5o),34o (5o), 338 (1oo), 324 (8o), 31o (58), 134 (22), 121 (22), 1o5 (25).

IR ($CHCl_3$) : 34oo (breit), 1775 (s), 175o (s), 168o (s), 1615 (s), 1615 (m), 157o (m) cm^{-1}

UV(in Methanol, qual.): λ_{max} 41o, 254

+ NaOH : λ_{max} 443, 323, 278, 24o,

Peracetylierung von Cycloleucomelon-diacetat

3 mg Cycloleucomelon-diacetat wurden mit 1 ml Acetanhydrid und einem Tropfen konz H_2SO_4 3o min. bei 6o-7o °C (Badtemperatur) gerührt.
Anschließend wurde 2o min. ohne Erwärmen gerührt.
Die Lösung wurde auf Eiswasser (5 ml) gegossen und mit Essigester ausgeschüttelt.

hellgelbe Mikrokristalle Ausbeute 2,5 mg

MS : m/e 5o8 (9%), 5o6 (4),466 (2o), 464 (12), 424 (5o), 422 (25), 382 (1oo), 38o (35), 34o (7o), 338 (9o), 324 (85), 31o (45).

Cycloleucomelon-monoacetat (Braun 1)

hellbraune Mikrokristalle Ausbeute 6 mg

$C_{2o}H_{12}O_8$ (38o)

MS : m/e 382 (M^++2,9%), 38o (28), 34o (1o), 338 (1oo), 324 (33), 31o (3o), 134 (5), 121 (5), 1o5 (7).

Cycloleucomelon 83

hellbraunes Pulver Ausbeute 8 mg

$C_{18}H_{1o}O_7$ (338)

MS : m/e 34o (25%, M^++2), 338 (1oo), 324 (5), 31o (12.5), 121 (5), 1o5 (7).

Cyclisierung von Leucomelon 86

2 mg synthetisches Leucomelon[59] wurden in THF gelöst und mit Ag_2CO_3/Celite versetzt einen Tag lang bei Raumtemperatur stehengelassen.
Das Reaktionsgemisch wurde filtriert, eingeengt und dünnschicht-chromatographisch untersucht.
Es erwies sich als identisch mit Cycloleucomelon.
Die Acetylierung des Reaktionsprodukts mit Acetanhydrid und einem Tropfen konz. H_2SO_4 ergab ein Peracetat, das identisch mit Cycloleucomelon-peracetat war.
hellgelbe Mikrokristalle Smp. 223-224 °C

7. ANTHRACOPHYLLUM 73/2o8

7.1. Aufarbeitung der Pilze

Die getrockneten Pilze (1.6 g) wurden etwas zerkleinert und mit Petrolether 4o-6o° behandelt. Die so entfetteten Pilze wurden mit Aceton (4x 2o ml) erschöpfend extrahiert. Die orange-gelben Farblösungen wurden eingeengt und ergaben einen Rohextrakt von 2oo mg.

7.2. Isolierung der Pigmente

Der Rohextrakt wurde in Essigester gelöst, ein unlösliches blau-schwarzes Pigment wurde durch Filtration abgetrennt und als Thelephorsäure identifiziert.
Der Essigester lösliche Extrakt wurde über eine Säule mit acetyliertem Polyamid chromatographiert.
Dabei eluierte Toluol/Essigester 1:1 eine gelbe Fraktion, Essigester/Methanol 9:1 eine braune Fraktion.

Die gelbe Fraktion erwies sich als untrennbares Gemisch aus Cycloleucomelon-diacetat und einem gelben Pigment Gelb 2.
Die braune Fraktion trennte sich über Sephadex LH 2o mit Methanol in drei braune Verbindungen: in Cycloleucomelon-monoacetat, Cycloleucomelon und in ein aubergine-farbenes Pigment.
Dieses Pigment wurde an Sephadex LH 2o mit Methanol/Wasser 7:3 rechromatographiert und aus Essigester/Petrolether ausgefällt.

Thelephorsäure 89

schwarzblaues, extrem schwerlösliches Pulver — Ausbeute 2o mg

$C_{18}H_8O_8$ (442)

UV qual. (in Ethanol): λ_{max} 483, 39o, 3o5, 264, 217
(in Pyridin): λ_{max} 493, 395, 311.

^{1}H-NMR (in DMSO-d_6) : δ = 7.33 (s, 2H), 7.13 (s,2H)

Cyclovariegatin-monoacetat 93 (aubergine-farbenes Pigment)

3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-acetoxy-7,8-dihydroxydibenzofuran-1,4-dion

bräunliches amorphes Pulver — Ausbeute 12 mg

$C_{2o}H_{12}O_9$ (396)

MS : m/e 398 (5%), 396 (M^+, 5), 356 (7), 354 (12), 326 (6), 154 (3o), 149 (18), 121 (1oo), 138 (68).

Cyclovariegatin-3,5',4"-triacetat 96

gelbe Mikrokristalle

$C_{24}H_{16}O_{11}$ (48o)

MS : m/e 482 (18), 48o (M^+,9), 44o (26),438 (2o) 396 (3o), 398 (38), 356 (55), 354 (1oo), 326 (52), 177 (7), 163 (5), 15o (1o), 149(9o) 135 (4), 121 (8o), 1o2 (85).

Peracetylierung von Cyclovariegatin-monoacetat 93

2 mg 93 wurden mit 1 ml Acetanhydrid und einem Tropfen konz. H_2SO_4 3o min. bei 6o-7o C (Badtemperatur) gerührt. Anschließend wurde noch 2o min. ohne Erwärmen gerührt Die Lösung wurde auf 5 ml Eiswasser gegossen und mit Essigester extrahiert.

Cyclovariegatin-peracetat 95

hellgelbe Mikrokristalle Ausbeute 1.5 mg

$C_{28}H_{2o}O_{13}$ (564)

MS : m/e 566 (8), 564 (M^+, 4), 524 (12), 522 (8), 482 (2o), 48o (12), 44o (3o), 438 (28), 398 (36), 396 (4o), 356 (8o), 354 (1oo).

Synthese von Cyclovariegatin 94

5,8 mg 2,5-Dihydroxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-(2,4,5-trihydroxyphenyl)-1,4-benzochinon[63] wurden mit 3 ml Methanol und 3 Tropfen konz. H_2SO_4 versetzt und 6 h refluxiert.
Das Reaktionsgemisch wurde an Sephadex LH 2o mit Methanol/Wasser 7:3 chromatographiert.

braunes, amorphes Pulver Ausbeute 3,6 mg

$C_{18}H_{1o}O_8$ (354)

Acetylierung von 94

2 mg 94 wurden mit 4 ml Acetanhydrid und 3 Tropfen konz. H_2SO_4 1 h bei 3o- 4o°C gerührt.
Das Reaktionsgemisch wurde auf 5 ml Eiswasser gegossen und mit Essigester ausgeschüttelt.

hellgelbe Mikrokristalle Ausbeute 1,5 mg

$C_{28}H_{2o}O_{13}$ (564)

8. BOLETOPSIS LEUCOMELAS

8.1. Aufarbeitung der frischen Pilze

Frische Fruchtkörper von B.LEUCOMELAS wurden vor der Extraktion gefriergetrocknet. Das getrocknete Material (5 g) wurde im Soxhlett zum Entfetten zunächst mit Petrolether 4o-6o° behandelt. Danach wurden die Pilze mit Aceton erschöpfend extrahiert.
Man erhielt einen schmutzig-weißen, kristallinen Rohextrakt von 6oo mg.

8.2. Isolierung der Substanzen

Der Rohextrakt wurde in Essigester gelöst, der unlösliche weiße Rüchstand wurde aus Ethanol umkristallisiert und konnte als Thelephorsäure-leucoperacetat identifiziert werden.
Der lösliche Extrakt wurde über präparative Dickschichtplatten (Kieselgel,'saures Laufmittel') in vier Substanzen Bl-1, Bl-2, Bl-3 und Bl-4 getrennt.
Die einzelnen Verbindungen wurden über präparative DC rechromatographiert und aus Essigester/Petrolether ausgefällt.

Thelephorsäure-leucoperacetat 97

weißes kristallines Pulver Ausbeute 5o mg

Smp. > 3oo°C

$C_{3o}H_{22}O_{14}$ (6o6)

MS :m/e 6o6 (M^+) 564, 522, 48o, 438, 396, 354(Base-peak)

IR (KBr) : 178o (ss), 161o (w), 148o (sh), 146o (s), 1375 (s). cm^{-1}.

Cycloleucomelon-leucoperacetat 98 (B1-1)

weißes kristallines Pulver Ausbeute 3o mg

Smp 2o3-2o4°C

$C_{3o}H_{24}O_{13}$ (592)

MS : m/e 592 (M^+,22%), 55o (1o), 5o8 (28), 466 (68), 424 (88), 382 (1oo), 34o (76).

IR (KBr): 1785 (ss),177o (sh), 1515 (w),146o (m), 138o (s) cm^{-1}.

Cycloleucomelon-leucopentaacetat 99 und 1oo (B1-2)

weißes kristallines Pulver

$C_{28}H_{22}O_{12}$ (55o)

Cycloleucomelon-leucotetraacetat-(1,2,4,5) 1o1 (B1-3)

weißes kristallines Pulver Ausbeute 35 mg

$C_{26}H_{2o}O_{11}$ (5o8)

Cycloleucomelon-leucotriacetat-(1,2,4) 1o2 (B1-4)

weißes kristallines Pulver Ausbeute 42 mg

$C_{24}H_{18}O_{1o}$ (466)

Peracetylierung des Rohextrakts

1o mg des in Essigester löslichen Rohextrakts wurde mit 5 ml Acetanhydrid und einem Tropfen konz H_2SO_4 1 h bei 3o-4o°C stehengelassen.
Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man einen weißen Feststoff, der nach DC-Vergleich und spektroskopischen Daten mit Cycloleucomelon-leucoperacetat 98 identisch war.

8.3. Aufarbeitung eines methanolischen Extrakts von B.LEUCOMELAS

Zur Verfügung standen Pilze, die 1973 in Kaltenbrunn gesammelt wurden und in Methanol/HCl eingelegt in der Tiefkühltruhe gelagert wurden.
Die intensiv blau-grün gefärbte Lösung wurde abfiltriert, die Pilze wurden mehrmals mit Methanol nachgewaschen. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man einen grau-grünen Rohextrakt, der zum Entfetten mit Petrolether digeriert wurde.

Der Rohextrakt (5oo mg) wurde über eine Säule mit Sephadex LH 2o chromatographiert. Dabei eluierte Methanol nacheinander drei Fraktionen : Bl-Farblos, Bl-Blau und Bl-Braun.
Die Fraktionen wurden an Sephadex LH 2o mit Methanol/ Wasser 4:1 rechromatographiert.
Bl -Farblos wurde nach DC-Vergleich und spektroskopischen Daten mit Cycloleucomelon-leucotriacetat 1o2 identifiziert.
Bl-Braun war identisch mit Cycloleucomelon 83.

3-(4-Hydroxyphenyl)-1,4-diacetoxy-2-hydroxydibenzofuran-7,8-dion 1o4 (Bl-Blau)

blaugrüne Mikrokristalle Ausbeute 5 mg

$C_{22}H_{14}O_9$ (422)

MS : m/e 424 (2o), 422 (M^+, 5),382 (4o),38o (1o), 34o (1oo), 338 (45),324 (6o), 31o (25), 121 (12).

Reduktive Acetylierung von 1o4

Eine Spatelspitze 1o4 wurde mit einer Spur von wasserfreiem Natriumacetat in 3 ml Acetanhydrid unter Rückfluß gekocht. Innerhalb von 9o min. gab man 2o mg Zinkstaub zu. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch filtriert und in Wasser gegossen. Nach Ausschütteln mit Essigester erhielt man einen weißen Feststoff, der nach DC-Vergleich und spektroskopischen Daten mit Cycloleucomelon-leucoperacetat 98 identisch war.

Smp 2o4°C Ausbeute Spuren

$C_{3o}H_{24}O_{13}$ (592)
(massenspektrometrisch)

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. M.Moser Die Gattung Phlegmacium, Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn(196o)

2. M.Gabriel Thèses, Université de Lyon(1965)

3. E.Töpfer-Petersen
Dissertation, Technische Universität Berlin (1973)

4. W.Steglich und E.Töpfer-Petersen
Z.Naturforsch. 28c, 255 (1973)

5. W.Steglich,E.Töpfer-Petersen,K.Gluchoff und N.Arpin
Phytochem. 11, 3299 (1972)

6. M.Moser Die Gattung Dermocybe (Fr.)Wünsche Schweizerische Zeitschrift f. Pilzk. 5o,153 (1972)

7. K.Gluchoff und W.Steglich
Travaux mycologiques, Bull.Soc.Linn. Lyon, Feb. 1974, 163

K.Gluchoff-Fiasson
Thèses, Université Claude Bernard Lyon 1 (1979)

8. J.Atherton,B.W.Bycroft,J.C.Roberts,D.Roffey und W.E.Wilcox J.Chem.Soc 1968, 256o

9. W.Steglich und E.Töpfer-Petersen
Z.Naturforsch. 27b, 1286 (1972)

1o.W.Steglich,E.Töpfer-Petersen und I.Pils
Z.Naturforsch. 28c , 354 (1973)

11. S.Takahashi,S.Kitanaka,M.Takido,U.Sankawa und S.Shibata Phytochem. 16, 999 (1977)

12. D.L.Dreyer,I.Arai,C.D.Bachmann,W.R.Anderson jr. R.G.Smith und G.D.Daves J.Amer.chem.Soc. 97, 4985 (1975)

13. S.Gatenbeck Acta Chem.Scand. 12, 1211 (1958)

14. A.J.Birch,A.J.Ryan und H.Smith J.Chem.Soc. 1958, 4773
A.J.Birch,R.I.Freyer,P.J.Thomsen und H.Smith Nature (Lond.) 19o, 441 (1961)

15. W.Steglich,R.Arnold,W.Lösel und W.Reininger Chem.Comm. 1972, 1o2

16. S.Shibata XXIVth InternationalCongress of Pure and Applied Chemistry, Hamburg 1973 Vol.2

17. T.M.Harris,A.D.Webb,C.M.Harris,P.J.Wittek,T.P.Murray J.Amer.Chem.Soc. 98, 6o85 (1976).

18. G.E.Evans,M.J.Garson,D.A.Griffin,F.J.Leeper und J.Staunton in: Further Perspectives in Organic Chemistry, Amsterdam 1978

19. T.M.Harris Tetrahedron, 33, 2159 (1977)
T.Money Chem.Review 7o, 553 (197o)

2o. J.Banville und P.Brassard J.Chem.Soc. 1976, 1852
J.Org.Chem. 41, 3o18 (1976)

21. W.Lösel Dissertation München 1968

22. E.Bachmann Diplomarbeit Bonn 1976

23. J.J.Bergman und W.D.Chandler Can.J.Chem. 5o, 353 (1971)

24. P.A.Lehmann Tetrahedron, 21, 363 (1965)

25. H.Benjamins,F.Haque Dar und W.D.Chandler
Can.J.Chem. 52, 2o55 (1974)

26. H.Kessler Angew. 82, 237 (197o)

27. Belegexemplar im Herbar Oertel

28. G.Snatzke Angew. 8o, 15 (1968)

29. M.Takido,S.Takahashi,K.Masuda und K.Yasukawa
Lloydia, 4o, 192 (1977)

3o. J.F.Grove J.Chem.Soc. 1972, 24o6

31. R.E.Bowman,C.P.Falshaw,C.S.Franklin,A.W.Johnson
und T.J.King J.Chem.Soc. 1963, 134o

32. Y.Ogihara,N.Kobayashi und S.Shibata
THL 1968, 1881

33. R.H.Thomson Naturally occurring quinones,
Academic Press London und New York 1971
und darin zitierte Literatur

34. W.K.Anslow und H.Raistrick
Biochem.J. 34, 1124 (194o)

35. S.Shibata Chem.Ind. 19, 1754 (1961)

36. S.Shibata,O.Tanaka und I.Kitagawa
Chem.Pharm.Bull. 3, 278 (1955)

37. H.Brockmann Fortsch.Chem.org.Naturstoffe
14, 141 (1957)

38. M.Moser und G.Keller unveröffentlicht

39. S.Shibata,E.Morishita,M.Kaneda,Y.Kimura,M.Takido
und S.Takahashi
Chem.Pharm.Bull. 17, 454 (1969)

4o. H.Brown,D.W.Cameron und U.Weiss
THL 1969 , 471

41. E.Fischer Chemie in unserer Zeit 9, 9o (1975)

42. H.Kessler in: Topics in Stereochemistry, Vol 7,
John Wiley 1973

43. W.Schlenk Ann. 368, 276 (19o9)
A.W.Hofmann Ber. 11, 335 (1878)

44. J.D.Bu'lock,D.C.Allport
Proc.Chem.Soc 1957, 264

45. O.C.Musgrave und D.Skoyles
Chem.Comm. 197o, 1461

46. Bocks,Brown und A.H.Todd
Proc.Chem.Soc. 1962, 117

47. H.Musso Angew. 75, 965 (1963)

48. G.Benfield,S.M.Bocks,K.Bromley und B.R.Brown
Phytochem. 3, 79 (1964)

49. B.R.Brown und A.H.Todd
J.Chem.Soc. ;1963, 5564

5o. E.Breitmaier und G.Bauer
^{13}C-NMR-Spektroskopie, Thieme-Verlag
Stuttgart 1977

51. G.Höfle Tetrahedron 33, 1963 (1977)

52. Y.Berger und A.Castonguay
OMR 11, 375 (1978)

53. W.Steglich,W.Lösel und W.Reininger
THL 1967, 4719

54. R.Singer The Agaricales in Modern Taxonomy
J.Cramer 1975

55. Belegexemplar im Herbar Horak.
Ich danke Herrn Prof. Horak für die freundliche Überlassung von ANTHRACOPHYLLUM-Arten.

56. M.Zanger Org.Magn.Res. 4, 1 (1972)

57. M.Akagi J.Pharm.Soc.Japan 62, 191 (1942)
J.Pharm.Soc.Japan 62, 2o2 (1942)

58. H.-W.Wanzlick Angew. 76, 313 (1964)

59. H.-J.Lohrisch Dissertation, Bonn 1977

6o. R.L.Edwards und M.Gill
J.Chem.Soc,Perkin Trans.I 1975,351

61. J.Gripenberg Tetrahedron, 1o, 135 (196o)

62. F.Kögl,H.Erxleben und L.Jänecke
Ann. 482, 1o5 (193o)

63. W.Steglich und H.-J.Lohrisch unveröffentlicht.

Lebenslauf

1951	geboren am 3.März in Laage, Kreis Güstrow als Tochter des Landwirts Karl Bachmann und seiner Frau Elfriede, geb. Metzler
1957-1961	Besuch der Grundschule in Bad Godesberg
1961-1969	Besuch des Amos-Comenius-Gymnasiums in Bad Godesberg und Reifeprüfung
1969-1976	Chemiestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn Vordiplom Juli 1972 mündliche Diplomprüfung Juli 1975 Diplomarbeit Juli 1976
1975	Heirat mit Dipl.Chem. Erhard Jägers
1976-198o	Promotion am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn unter der Leitung von Prof.Dr. Wolfgang Steglich.